

# Herstellung und Charakterisierung neuartiger Hybridnanostrukturen für bioanalytische Anwendungen

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

## Doktor-Ingenieur

(Dr.-Ing.)

vorgelegt der

Fakultät für Maschinenbau

der Technischen Universität Ilmenau

von Herrn

**Dipl.-Ing. Norbert Jahr**

geboren am 16.01.1982 in Gera/Deutschland

Gutachter:

1. Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Fritzsche, IPHT Jena
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. habil. Eberhard Manske, TU Ilmenau
3. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Michael Köhler, TU Ilmenau

Tag der Einreichung: 28.06.2013

Tag der öffentlichen Verteidigung: 19.07.2014

Never give in –  
never, never, never, never,  
in nothing great or small, large or petty,  
never give in except to  
convictions of honour and good sense.

*Sir Winston Churchill*

Dinge wahrzunehmen, ist der Keim der Intelligenz.

*Lao-Tse*





## Zusammenfassung (Abstract)

Die Nanotechnologie dringt immer stärker in viele Bereiche unseres Alltagsleben vor, zumal immer mehr Anwendungsmöglichkeiten von Nanostrukturen erforscht werden. So bieten Nanostrukturen eine hohe Funktionalität auf kleinstem Raum, die sie unter anderem auch für Anwendungen in den Lebenswissenschaften interessant machen. Neueste Entwicklungen haben gezeigt, dass insbesondere optische Nanostrukturen ein großes Potential für die bioanalytische Messtechnik besitzen (z.B. Erkennung von Krankheitserregern in Pflanzen).

An diesem Punkt setzen die Untersuchungen für die in dieser Arbeit entwickelte Hybridnanostruktur an. Diese neuartige Nanostruktur, bestehend aus nichtplasmonischen Chrom-Nanoholes und plasmonischen Edelnanopartikeln, stellt eine interessante Plattform sowohl für die Biochiptechnologie als auch für die biologische Sensorik dar. Ein Kernpunkt dieser Arbeit sind daher Untersuchungen zur Herstellung dieser Hybridnanostruktur mittels geführter Selbstorganisation. Dabei werden verschiedene Varianten betrachtet, die von einer Assemblierung mittels eintrocknenden Tropfens bis zur DNA-geführten Immobilisierung reichen. Von besonderer Bedeutung ist die Untersuchung des Einflusses verschiedener selbstorganisierender Monolagen wie zum Beispiel Monolagen aus Dodecyl-Phosphatsäure. Die Ergebnisse der Immobilisierungsversuche werden mittels Rasterkraft- und Rasterelektronenmikroskopie charakterisiert und anhand dessen beurteilt.

Ein weiteres zentrales Element der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der optischen Eigenschaften der einzelnen Nanostrukturen sowie deren Änderung nach der Assemblierung der entwickelten Hybridnanostruktur. Die optische Charakterisierung erfolgt mittels mikrospektroskopischer Messungen an einzelnen Nanoholes und automatisierter Bildauswertung von Kameradaten. Anhand dieser umfangreichen Messungen können verschiedene Einflussparameter wie Größe und Material der Nanopartikel untersucht und die optischen Eigenschaften der Hybridnanostruktur statistisch bewertet werden. Zusätzlich konnte mit dem Aufbau eines bildgebenden Spektrometers gezeigt werden, dass die Verbindung einer hohen spektralen Auflösung eines Spektrometers mit dem hohen Datendurchsatz der Bildauswerteverfahren möglich ist und dass sich das bildgebende Spektrometer für die Messung optischer Nanostrukturen bestens eignet. Es konnte mittels unterschiedlicher Modellsubstanzen gezeigt werden, dass sich die Hybridnanostruktur als bioanalytische Testplattform eignet.

Abschließend konnte anhand von biologisch relevanten Testsystemen gezeigt werden, dass diese Plattform sehr gut zur Detektion von Molekülerkennungsreaktionen (z.B. DNA) in der Bioanalytik geeignet ist.



## Abstract

The impact of nanotechnology in various aspects of the daily life is continually increasing, especially as more applications for nanostructures are being discovered. Nanostructures provide a high functionality within the smallest of areas, which makes them interesting for many applications in the life sciences. Recent developments have shown that optical nanostructures have great potential within bio-analytical sensor technology (e.g. in the detection of pathogens in plants).

This study focuses on the development of a novel hybrid nanostructure. This new hybrid nanostructure, consisting of non-plasmonic nanoholes and plasmonic noble-metal nanoparticles, presents an interesting platform both for biochip and biosensing technologies. A key element of the presented work is the investigation of using guided self-assembly fabrication for this hybrid nanostructure. Different methods for self-assembly, ranging from droplet evaporation to DNA-directed immobilization, are researched. Of special importance is the research into the influence of self-assembling monolayers for immobilization of nanoparticles in nanoholes, for example formed from dodecyl-phosphonic acid, for the fabrication of the nanostructure. Atomic force and scanning electron microscopes are used to characterize the hybrid nanostructures created by the self-assembling processes.

Another central part of this work is the study of the optical behavior of the individual nanostructures and the change in these optical characteristics found in the assembled hybrid nanostructure. Microspectroscopic measurements and automated image processing of camera images are used for the optical characterization. An extensive number of measurements make it possible to determine the different influential factors, like size and material of the nanoparticles within the nanostructure. A statistical analysis of the optical properties of the hybrid nanostructures is also performed. The investigation of different influential factors helps to understand the optical properties of the hybrid nanostructure and helps to evaluate its applicability for bio-analytical applications.

Based on the knowledge gained from these results, the new nanostructure is tested with different model substances. The proof-of-principle experiment with a biologic relevant test system (e.g. DNA) shows the nanostructure's suitability for the detection of molecules. Additionally the imaging spectrometer, setup within this project, shows the possibility of fusing the high spectral resolution of a spectrometer with the high data throughput obtained with image processing. The imaging spectrometer is therefore ideally suited for the characterization of optical nanostructures.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>11</b>
<b>Verzeichnis der verwendeten Formelzeichen</b>	<b>13</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>15</b>
1.1 Zielstellung . . . . .	16
<b>2 Grundlagen und Stand der Technik</b>	<b>19</b>
2.1 Plasmonik und optische Eigenschaften von Nanostrukturen . . . . .	19
2.1.1 Physikalische Grundlagen der Plasmonik . . . . .	19
2.1.2 Messung von plasmonischen Effekten . . . . .	21
2.2 Grundlagen und Begriffe der Bioanalytik . . . . .	28
2.2.1 Der Begriff Biosensor . . . . .	28
2.2.2 Biochiptechnologie . . . . .	29
2.2.3 Auslesetechniken in der Biotechnologie . . . . .	30
2.2.4 Plasmonische Nanostrukturen als Sensoren in der Bioanalytik . . . . .	31
2.3 Herstellungsstrategien für Nanoholes und Hybridnanostrukturen . . . . .	33
2.3.1 Focused Ion Beam . . . . .	33
2.3.2 Elektronenstrahlolithographie . . . . .	33
2.3.3 Herstellung von Nanoholes durch Colloidal Lithography . . . . .	33
2.3.4 Integration von Nanopartikeln in Nanoholes durch gesteuerte Selbstassemblierung . . . . .	35
2.4 Hyperspectral Imaging für parallele Sensorauswertung . . . . .	36
2.4.1 Hyperspectral Imaging . . . . .	36
2.4.2 Fourier-Transformations-Spektroskopie . . . . .	37
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>39</b>
3.1 Materialien . . . . .	39
3.2 Herstellung von Nanoholestrukturen in Chromschichten . . . . .	39
3.2.1 Focused Ion Beam - fokussierter Ionenstrahl (FIB) . . . . .	39
3.2.2 Elektronenstrahlolithographie - Electron Beam Lithography . . . . .	40
3.2.3 Substratlays für die Hybridnanostrukturen . . . . .	41
3.2.4 Herstellung von Silbernanoprismen . . . . .	42
3.3 Prozessierung von Nanoholestrukturen zur Herstellung von Hybridnanostrukturen . . . . .	44
3.3.1 Reinigung der Substrate . . . . .	45

3.3.2	Aktivierung der Substrate . . . . .	45
3.3.3	Immobilisierung von Nanopartikeln . . . . .	46
3.3.4	Blockierungsmethoden . . . . .	47
3.4	Rasterkraft- und Rasterelektronenmikroskope . . . . .	49
3.4.1	Rasterkraftmikroskopie, AFM . . . . .	49
3.4.2	Rasterelektronenmikroskopie, REM . . . . .	50
3.4.3	Transmissionselektronenmikroskopie, TEM . . . . .	50
3.5	Mikroskopie und Spektrometrie . . . . .	51
3.6	Automatisierte Auswertung von Biosensoren . . . . .	54
3.6.1	Extraktion von Merkmalen aus spektralen Daten . . . . .	54
3.6.2	Extraktion von Merkmalen aus Bilddateien . . . . .	55
3.6.3	Prozessierung von Imaging-Spektrometerdaten . . . . .	56
3.7	Simulationen . . . . .	57
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion der Charakterisierung der Hybridnanostruktur für die Anwendung in der Bioanalytik</b>	<b>59</b>
4.1	Herstellung und Charakterisierung von Nanopartikeln . . . . .	60
4.2	Herstellung und charakteristische Eigenschaften von Chrom-Nanoholes . . . . .	65
4.3	Kombination von Nanoholes mit Nanopartikeln . . . . .	69
4.3.1	Strategien zur kontrollierten Integration von Nanopartikeln in Nanoholes	70
4.3.2	Optische Eigenschaften von Nanoholes mit Nanopartikeln . . . . .	76
4.4	Nachweis von Molekülen in der Hybridnanostruktur . . . . .	89
4.4.1	LSPR-Sensing . . . . .	89
4.4.2	Nachweis von Nanopartikelmarkern . . . . .	92
4.5	Erweiterung der Messtechnik mittels hyperspektraler Bildgebung . . . . .	94
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>101</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>106</b>
	<b>Anhang</b>	<b>112</b>
<b>A</b>		<b>113</b>
A.1	Materialien . . . . .	113
A.2	Geräte . . . . .	114
	<b>Danksagung</b>	<b>115</b>

# Abkürzungsverzeichnis

SPP	Surface Plasmon Polariton - Oberflächenplasmonpolariton
SPR	Surface Plasmon Resonance - Oberflächenplasmonenresonanz
LSPR	Localised Surface Plasmon Resonance - lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz
LSPP	Localised Surface Plasmon Polariton - lokalisierte Oberflächenplasmonenpolaritonen
FIB	Focused Ion Beam - fokussierter Ionenstrahl
EBL	Elektronenstrahlolithographie - Electron Beam Lithography
EOT	Extra Ordinary Transmission
CDEW	„Composite Diffracted Evanescent Wave“-Modell
doPhosAc	1-dodecyl-Phosphosphatsäure
DNA	Desoxyribonucleic Acid
CL	Colloidal Lithography - Lithographie mittels Mikropolymerkugeln
GSA	guided-self-assembly - geführte Selbstimmobilisierung
DDI	DNA geführte Immobilisierung - DNA directed immobilization
PDMS	Polydimethylsiloxan
MCH	Mercaptohexanol
MUA	Mercaptoundecansäure
UV-Crosslinking	Verbindung durch die Bestrahlung mit ultravioletter Licht
AFM	Atomic Force Microscope - Rasterkraftmikroskop
REM	Rasterelektronenmikroskopie
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
FEM	Finite Elemente Methode
GMMM	Generalized Multiple Multipol Method
GOPS	(3-Glycidoxypropyl)trimethoxysilan
ImSpek	Imaging Spektrometer - bildgebendes Spektrometer
ICS	Infinity-corrected System
SAM	Self-Assembly-Monolayer - Selbstorganisierende Monolagen
FT-Spektroskopie	Fourier-Transformations-Spektroskopie
$S = d\lambda/dn$	Sensitivität als Verhältnis von Ausgangssignal zu Eingangssignal
M	$c = \text{mol/l}$
DLS	Dynamic Light Scattering - dynamische Lichtstreuung





# Verzeichnis der verwendeten Formelzeichen

$e$	Elementarladung eines Elektrons
$E$	elektrische Feldstärke
$D$	elektrische Flussdichte
$H$	magnetische Feldstärke
$B$	magnetische Flussdichte
$m$	Masse
$\omega$	Kreisfrequenz
$\omega_p$	Plasmakreisfrequenz
$r$	allgemeiner Raumvektor
$\alpha$	Einfallswinkel
$\beta$	Ausfallswinkel
$\epsilon$	Dielektrizitätskonstante
$\epsilon_r$	relative Dielektrizitätszahl
$\hat{\epsilon}$	relative komplexe Dielektrizitätszahl
$\epsilon'$	$Re \{ \hat{\epsilon} \}$
$\epsilon''$	$Im \{ \hat{\epsilon} \}$
$\mu$	magnetische Permeabilität
$n$	optische Brechzahl
$r, \phi, \theta$	Raumvariablen in Kugelkoordinaten
$k$	Wellenvektor
$\Pi$	Debye-Potentiale
$\psi, \eta$	Ricatti-Bessel-Funktionen
$I$	Intensität
$\lambda$	Wellenlänge



# 1 Einleitung

„Nur scheinbar hat ein Ding eine Farbe, nur scheinbar ist es süß oder bitter, in Wirklichkeit gibt es nur Atome im leeren Raum.“ (Demokrit, griechischer Philosoph)

Schon seit der Antike versuchen die Menschen in die kleinsten Dimensionen der Materie vorzudringen und deren Eigenschaften zu verstehen. So wurde bereits in der Antike erkannt, dass mit feinverdünnten Gold stark rot leuchtende Gläser und Flüssigkeiten hergestellt werden können. Deren Eigenschaften wurden erstmals von Michael Faraday systematisch untersucht. Diese Ergebnisse sowie seine Untersuchungen zur Wechselwirkung von Gold mit Licht<sup>[1]</sup> wurden von ihm 1857 vorgestellt. Faraday hatte seinerseits noch nicht die Möglichkeit, einzelne Partikel sichtbar zu machen. Dies gelang erstmals mit der Erfindung des Ultramikroskops von Siedentopf und Zsigmondy im Jahre 1902.<sup>[2]</sup> Mit Hilfe dieses Apparates war es möglich, Teilchen im Bereich von Nanometern zu visualisieren. Richard Zsigmondy bekam 1925 für die Erfindung des Ultramikroskops sowie für die Untersuchung kolloidaler Lösungen den Nobelpreis für Chemie. Der optische Aufbau dieses Mikroskops ist im Prinzip bis heute erhalten geblieben und wird auch heute noch dazu verwendet, Edelmetallnanopartikel abzubilden.<sup>[3]</sup>

Die Entwicklung der Nanotechnologie wurde in den 1960er-Jahren durch die Fortschritte in der Mikroelektronik vorangetrieben. Nachdem die Miniaturisierung auf diesem Gebiet in den Nanometerbereich vordrang, wurde es möglich, die optischen Eigenschaften von Metallen zu nutzen, die bereits Faraday in Lösungen untersuchte. Die Entwicklung optischer Nanostrukturen sowohl in Lösung als auch planar wurde in den letzten zwei Jahrzehnten zusätzlich durch eine zunehmende Nachfrage aus dem Bereich der Lebenswissenschaften gefördert. So können Nanostrukturen beispielsweise als Kontrastmittel für die Bildgebung in der Medizin sowie in der medizinischen Therapie eingesetzt werden. Auch eignen sich Nanostrukturen sehr gut zur Erkennung von Krankheitserregern durch den Nachweis spezifischer Erkennungsreaktionen von Molekülen. Bei der Detektion bereits kleinster Konzentrationen von Molekülen wie etwa DNA zeigen gerade optische Nanostrukturen eine besonders hohe Messempfindlichkeit.<sup>[4]</sup> Für dieses Anwendungsgebiet werden ständig neue und bessere Nanostrukturen entwickelt, die eine hohe Sensitivität, aber auch einfache Herstellungsmöglichkeiten und eine simple Handhabung besitzen sollen.<sup>[5]</sup> Eine geeignete Methode, welche die oben genannten Anforderungen erfüllt, ist die Selbstassemblierung, mit der sich neue Hybridnanostrukturen aus verschiedenen Elementen herstellen lassen.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung einer neuen Hybridnanostruktur zum Einsatz in der bioanalytischen Messtechnik, wobei vor allem Fragestellungen wie die Herstellung von Hybridnanostrukturen, deren optische Eigenschaften sowie deren Potential und Anwendbarkeit für die Bioanalytik betrachtet werden.

Zur Herstellung von plasmonischen Nanostrukturen gibt es verschiedene Wege. So kommen in der Halbleiterindustrie bevorzugt sogenannte „top-down“-Verfahren zum Einsatz, die Nanostrukturen über die Verkleinerung großer Strukturen herstellen. Ein Beispiel hierfür ist die Photolithographie. Alternativ werden Nanostrukturen über den Weg der chemischen Synthese und Selbstorganisation hergestellt. Diese Verfahren werden unter dem Begriff „bottom-up“ zusammengefasst. Die in dieser Arbeit vorgestellten Hybridnanostrukturen verbinden Herstellungsprozesse aus der Halbleitertechnologie mit aus chemischen Synthesen gewonnenen Nanostrukturen. Die Verbindung erfolgt dabei über die sogenannte geführte Selbstorganisation als paralleles und effizientes Herstellungsverfahren.

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit ist die Charakterisierung der optischen Eigenschaften der neu entstandenen Hybridnanostrukturen. Eine umfassende Charakterisierung der optischen Eigenschaften erfolgt über spektrale Messungen an einzelnen Nanostrukturen. Diese Messungen geben Aufschluss über charakteristische Merkmale einzelner Nanostrukturen, die mit zusätzlichen Daten aus ultramikroskopischen Messungen (Atomic Force Microscope - Rasterkraftmikroskop (AFM), Rasterelektronenmikroskopie (REM)) verglichen werden, um Einflussfaktoren zu erkennen und zu optimieren. In Hinblick auf spätere Anwendungen werden Möglichkeiten der Bildverarbeitung und der automatisierten Erfassung von Messdaten mit neuen Messkonzepten gesucht. Diese Verfahren sollen die Messung spektraler Daten mit hoher spektraler Auflösung und hohem parallelen Durchsatz ermöglichen.

Insbesondere für Applikationen in der Bioanalytik sind neue plasmonische Sensorplattformen ein wichtiger Beitrag für zukünftige Geräte und Tests in der Vor-Ort Diagnostik. Dabei stehen vor allem robuste Tests auf Geräten im Vordergrund, die auch unter realen Bedingungen außerhalb des Labors funktionieren. Weiterhin ist eine hohe Sensitivität und Spezifität nötig, um auch kleinste Konzentrationen zum Beispiel von Krankheitserregern nachweisen zu können. In dieser Arbeit sollen diese Fragen mit Hilfe einer neuen Hybridnanostruktur beantwortet werden. Durch die Kombination verschiedener Nanostrukturen sollen neue Eigenschaften geschaffen werden, mit deren Hilfe eine Plattform für bioanalytische Anwendung entsteht. Ausgehend von dieser Plattform werden neuartige Auswertekonzepte untersucht, die dann zu einem Gerät für die bioanalytische Vor-Ort Diagnostik führen könnte, mit dem Ziel, schnell und zuverlässig Krankheitserreger identifizieren zu können.

## 1.1 Zielstellung

Optische Nanostrukturen weisen ein großes Potential für die Verwendung in der Bioanalytik auf. Dieses Potential basiert auf der Ausnutzung der Plasmonenresonanz und deren Sensitivität gegenüber lokalen Änderungen des Brechungsindex. Aber auch als Marker liefern diese Nanostrukturen ein starkes und beständiges Signal. So kann bei der Erkennung von Krankheitserregern eine spezifische DNA-Sequenz des Erregers nachgewiesen werden. Dieser Nachweis wird durch die Messung der Wellenlänge der Plasmonenresonanz realisiert, die durch

die Erkennungsreaktion verschoben wird. Auch kann diese Reaktion durch die Anwesenheit des optischen Signals des plasmonischen Markers nachgewiesen werden.

Die Intention bei der Entwicklung neuer Hybridnanostrukturen besteht in der Schaffung einer optischen Nanostruktur, die ein starkes optisches Signal liefert und mit einer hohen Sensitivität und einem hohen Durchsatz einfach auszulesen ist. Mit diesen Eigenschaften ausgestattet, stellt sie eine einfach zu bedienende Plattform für die Bioanalytik dar, die sich dank ihrer einfachen Auslesetechnik sehr gut für die Vor-Ort-Diagnostik eignet.

Ausgehend von den oben beschriebenen Anforderungen und basierend auf verschiedenen selbstorganisierenden Methoden wird eine neuartige Hybridnanostruktur entwickelt. Dazu werden als erstes die Eigenschaften verschiedener plasmonischer Nanopartikel untersucht und plasmonische Nanopartikel mit variablen spektralen Eigenschaften hergestellt. Da zu erwarten ist, dass die optischen Eigenschaften der Chrom-Nanoholes die optischen Eigenschaften der Hybridnanostruktur beeinflussen, sollen auch diese Parameter näher betrachtet werden.

Zur Herstellung der Hybridnanostruktur sollen die Eigenschaften unterschiedlicher selbstorganisierender Monolagen untersucht werden. Die nach der Immobilisierung der Nanopartikel entstandenen neuen Hybridnanostrukturen werden anschließend mittels ultramikroskopischer Verfahren wie AFM oder REM analysiert. Dabei stehen die Optimierung des Immobilisierungsprozesses mit Hilfe der verschiedenen Self-Assembly-Monolayer - Selbstorganisierende Monolagen (SAM) im Vordergrund. Diese Ergebnisse werden mit den Messwerten optischer Untersuchungen verglichen, um die Änderungen in den optischen Eigenschaften analysieren zu können.

Um die entstandene Hybridnanostruktur als Plattform in der Bioanalytik einsetzen zu können, müssen diejenigen optischen Parameter bestimmt werden, mit denen eine schnelle parallele Messwertaufnahme und -analyse ermöglicht wird. Es sollen die optimalen Messparameter bestimmt und eine optimierte automatisierte Datenverarbeitung entwickelt werden. Die Eigenschaften der Hybridnanostruktur sollen mittels Mikrospektroskopie sowie anhand der Farbwerte der Mikroskopkamera bestimmt werden. Die optische Charakterisierung der Hybridnanostrukturen wird auf dem Weg der spektralen Messung einzelner Nanoholes mit dem Ziel einer hohen spektralen Auflösung und einer detaillierten Aufschlüsselung der spektralen Eigenarten erfolgen. Zudem wird auch die Möglichkeit der Informationsgewinnung aus den Daten der Bildverarbeitung mit dem Ziel der schnellen und parallelen Verarbeitung von optischen Messungen an der Hybridnanostruktur gezeigt. Die Ergebnisse beider Verfahren werden mittels statistischer Verfahren ausgewertet und klassifiziert, um die beeinflussenden Faktoren zur Verwendung dieser Struktur in der Bioanalytik zu identifizieren.

Um die Struktur effektiv nutzen zu können, soll untersucht werden, ob sich die neuen Nanostrukturen aufgrund ihrer optischen Eigenschaften zur Anwendung als Biosensor oder Biochip eignen. Dabei wird zunächst die Sensitivität anhand von Testanalyten untersucht. Diese Untersuchungen basieren auf der Veränderung des globalen oder des lokalen Brechungsindex und sollen mit Hilfe mikrospektroskopischer Messungen auf resultierende

Änderungen der spektralen Eigenschaften getestet werden. Abschließend soll anhand eines biologisch relevanten Testsystems die Eignung der Hybridnanostruktur als Plattform in der Bioanalytik nachgewiesen werden.

Nach dem „Proof-of-Principle“-Test der neuentwickelten Hybridnanostruktur für die Bioanalytik soll eine messtechnische Plattform geschaffen werden, die eine parallele Datengewinnung mit hoher spektraler Auflösung ermöglicht. Dafür bilden die beiden bisher verwendeten Charakterisierungsmethoden den Ausgangspunkt eines in dieser Arbeit entwickelten bildgebenden Spektrometers, welches die Vorteile beider Verfahren vereinen soll. Die Vorzüge der daraus resultierenden parallelen Datengewinnung werden demonstriert.

## 2 Grundlagen und Stand der Technik

### 2.1 Plasmonik und optische Eigenschaften von Nanostrukturen

#### 2.1.1 Physikalische Grundlagen der Plasmonik

Nanostrukturen ändern ihre optischen Eigenschaften gegenüber makroskopischen Objekten gleichen Materials. Dieses außergewöhnliche Verhalten basiert auf der Interaktion von Licht mit den Nanoobjekten und wird unter dem Begriff Plasmonik zusammengefasst. Der Name Plasmonik leitet sich von den gequantelten Elektronenschwingungen in der Nanostruktur, den sogenannten Plasmonen, her. Um die Funktionen von Nanostrukturen zu verstehen, werden die verschiedenen theoretischen Aspekte der optischen Eigenschaften von Plasmonen betrachtet.

Zur Beschreibung der optischen Eigenschaften von Nanostrukturen, insbesondere von metallischen Nanostrukturen, können verschiedene physikalische Phänomene wie Streuung und Absorption im Zusammenhang mit den kleinen Dimensionen der Strukturen erklärt werden. Mit Hilfe der Theorie von Gustav Mie<sup>[6]</sup> lassen sich die optischen Eigenschaften von Nanopartikeln beschreiben, da diese Theorie die Maxwell-Gleichungen für kleine sphärische Körper (Nanopartikel) analytisch löst und deren optische Eigenschaften beschreibt. Neben den sphärischen Nanopartikeln werden auch die optischen Eigenschaften anderer Nanostrukturen bei der Interaktion mit Licht anhand ihrer Kenngrößen beleuchtet. Von großer Bedeutung sind hier insbesondere die physikalischen Zusammenhänge von komplexer dielektrischer Funktion, Plasmafrequenz und dem Effekt der Plasmonenpolaritonen. Auf dieser Basis können Parameter gefunden werden, die das optische Verhalten der Hybridnanostruktur verändern.

Die Materialgleichungen von Maxwell bilden den Ausgangspunkt für die Beschreibung der Interaktion von elektromagnetischen Feldern mit Metallen. Der wichtigste Materialparameter für die Plasmonik ist die relative Dielektrizitätszahl  $\epsilon_r$  (Gl. 2.1), mit der sich die optischen Eigenschaften von Metallen beschreiben lassen.

$$\vec{D} = \epsilon_0 \epsilon_r \vec{E} \quad (2.1)$$

$$\vec{B} = \mu_0 \mu_r \vec{H} \quad (2.2)$$

Der Materialparameter  $\epsilon_r$  lässt sich vereinfacht durch das Modell von Drude<sup>[7]</sup> und Sommerfeld<sup>[8]</sup> gewinnen, welches auf der kinetischen Gastheorie basiert. Dabei wird angenommen, dass sich die äußeren Elektronen (Leitungselektronen) im Metall gleich einem Gas frei bewegen können und bei ihrer Bewegung durch Stöße mit anderen Elektronen gebremst werden. Wirkt nun eine äußere Kraft, hervorgerufen durch ein

elektromagnetisches Feld, auf die Elektronen, so bewegen sich die Elektronen durch dieses äußere elektromagnetische Feld. Diese Bewegung wird durch (Gl. 2.3) beschrieben.<sup>[9,10]</sup>

$$m\ddot{\vec{r}} + m\beta\dot{\vec{r}} = e\vec{E} \quad (2.3)$$

$$\text{mit } \vec{E} = E_0 e^{-i\omega t} \quad (2.4)$$

Diese Gleichung ist die Bewegungsgleichung für ein Elektron mit der Masse  $m$  und dem Raumvektor  $\vec{r}$ <sup>1</sup>, das sich in einem Festkörper bewegt und mit dem Dämpfungskoeffizient  $\beta$  gedämpft wird, während eine äußere Kraft  $e\vec{E}$  auf das Elektron der Ladung  $e$  wirkt. Durch Lösen dieser Gleichung (Gl. 2.5) unter Verwendung eines zeitharmonischen elektrischen Feldes erhält man für das Elektron eine abklingende Bewegung, dargestellt durch Term  $i$ , und eine periodische Bewegung, dargestellt durch Term  $ii$ , die durch das äußere Feld induziert wird.

$$r = r_0 - \underbrace{\frac{1}{\beta} v_0 e^{-\beta t}}_{(i)} - \underbrace{\frac{e}{m(\omega^2 + i\beta\omega)} E_0 e^{-i\omega t}}_{(ii)} \quad (2.5)$$

Die periodische Bewegung der Ladung (Term  $ii$ ) führt durch die zeitliche Änderung zu einem Stromanstieg im Medium, der sich mit der Stromdichte  $j$  (Gl. 2.6) beschreiben lässt.

$$j = Ne\dot{r} = \frac{Ne^2}{m(\beta - i\omega)} E = \sigma E \quad (2.6)$$

wobei  $N$  die Anzahl der Elektronen ist und  $\sigma$  die elektrische Leitfähigkeit repräsentiert. Wird dieser Ausdruck wiederum in die Gleichung für die relative Permittivität  $\epsilon_r$  eingesetzt und ein nicht magnetischer Leiter vorausgesetzt ( $\mu = 1$ ), so berechnet sich die komplexe Dielektrizitätszahl (Permittivität  $\hat{\epsilon}$ ) zu:

$$\hat{\epsilon} = \epsilon(\omega) - i \frac{\sigma(\omega)}{\omega} = 1 - \frac{Ne^2}{m} \frac{1}{(\beta - i\omega)} \quad (2.7)$$

$$Re\{\hat{\epsilon}\} = 1 - \frac{4\pi Ne^2}{m(\omega^2 + \beta^2)} \quad (2.8)$$

$$Im\{\hat{\epsilon}\} = \frac{4\pi Ne^2 \beta}{m\omega(\omega^2 + \beta^2)} \quad (2.9)$$

Aus den Gleichungen 2.8 und 2.9 lässt sich eine kritische Frequenz (Gl. 2.10) ableiten, bei der sich das optische Verhalten von Metallen ändert. So ergibt sich aus (Gl. 2.8), dass der Realteil von  $\hat{\epsilon}$  für die Quadrate der Frequenzen  $\omega^2 < \omega_p^2$  kleiner Null und der Imaginärteil  $\hat{\epsilon}$  (Gl. 2.9) größer Null ist. Das führt dazu, dass Metalle unterhalb dieser Frequenz optisch dicht sind und eine Reflektivität nahe eins besitzen.

$$\omega_p^2 = \frac{4\pi Ne^2}{m} - \beta^2 \quad (2.10)$$

Wird die Frequenz, dargestellt als Quadrat der Kreisfrequenz, größer als die kritische Frequenz ( $\omega^2 > \omega_p^2$ ), dann ändert sich das Verhalten von reflektierend zu transparent. Dieser Effekt bedingt in endlichen Körpern optische Resonanzen wie zum Beispiel die sogenannten

<sup>1</sup>mit  $\dot{\vec{r}} = \frac{d\vec{r}}{dt}$  und  $\ddot{\vec{r}} = \frac{d^2\vec{r}}{dt^2}$  als zeitliche Ableitungen des Raumvektors



Mie-Resonanzen.<sup>2</sup> Das Modell von Drude und Sommerfeld vernachlässigt allerdings die Tatsache, dass sowohl die inneren Elektronen als auch das Atomgitter einen Einfluss auf die Dielektrizitätszahlen haben. Diese Effekte bewirken eine zusätzliche Dämpfung und können ergänzend im Modell von Drude und Sommerfeld berücksichtigt werden.

Mit diesem Modell können die Begriffe Plasmon und Plasmonpolariton erklärt werden. Die kritische Frequenz, bei welcher der Übergang von reflektierend zu transparent erfolgt, wird Plasmafrequenz  $\omega_p$  genannt. Eine Schwingung der freien Ladungsträger (Elektronen) gegen das Gitter (Ionenrümpfe) wird als Plasmaoszillation bezeichnet, wovon sich der Begriff Plasmon ableitet. Das Plasmon ist eine gequantelte Schwingung in einem Plasma. Koppelt diese gequantelte Schwingung mit elektromagnetischen Feldern außerhalb des Metalls, wird das als Plasmonpolariton bezeichnet. Gerade diese Plasmonenpolaritonen sind für die besonderen optischen Eigenschaften von Metallen verantwortlich, wenn entsprechende geometrische Randbedingungen an den Grenzflächen gesetzt werden. Diese Eigenschaften lassen sich dabei über globale Parameter wie Streuung, Absorption und Extinktion darstellen. Allgemein beschreiben diese drei Parameter einen Verlust der Intensität der einfallenden elektromagnetischen Welle. So beschreibt die Absorption den Verlust an Licht, der in Wärmeenergie im Material umgewandelt wird. Die Streuung ist als derjenige Anteil an Licht definiert, dessen Ausbreitungsrichtung sich bezogen auf die Ursprungswelle ändert. Die Extinktion fasst beide Größen zusammen, da in der Regel Streuung und Absorption nicht separat messbar sind.

### 2.1.2 Messung von plasmonischen Effekten

#### Oberflächenplasmonen-Polaritonen

Ein Effekt, der in der bioanalytischen Messtechnik häufig zur Anwendung kommt, basiert auf dem Erzeugen von Surface Plasmon Polariton - Oberflächenplasmonpolariton (SPP). Dabei wird die Interaktion der Biomoleküle mit dem elektrischen Nachfeld der Plasmonen genutzt. Die Entstehung von SPPs soll im Folgenden erklärt werden, um einen Vergleich dieser Methode mit der Hybridnanostruktur zu ermöglichen und um den Effekt der lokalisierten Oberflächenplasmonen besser erklären zu können. Dieser Effekt beruht auf der Interaktion von Licht und Metalloberflächen und der Entstehung von evaneszenten Wellen an Oberflächen, die Oberflächenplasmonenpolaritonen hervorrufen. Da die Oberflächenplasmonen-Polaritonen an Grenzflächen zwischen Metall und dielektrischer Oberfläche entstehen, ist die Totalreflexion ein wichtiger Effekt. Wird Licht an einer Grenzfläche zwischen zwei Medien eingestrahlt, so wird es nach dem Gesetz von Snellius gebrochen. Dieser Effekt wird über das Verhältnis von

---

<sup>2</sup>Wird die Wellengleichung für Edelmetallnanopartikel (Kugeln) angewendet, treten bei bestimmten Wellenlängenresonanzen auf, siehe Localised Surface Plasmon Resonance - lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz Kap. 2.1.2

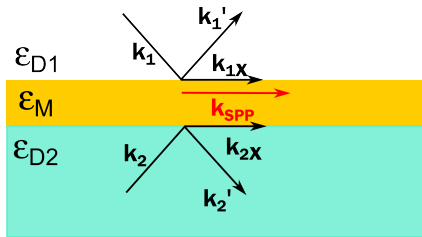
Einfallswinkel  $\alpha$  und Ausfallswinkel  $\beta$  in Abhängigkeit vom Verhältnis der Brechzahlen ( $n_1$ ,  $n_2$ ) oder der Permittivitäten ( $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_2$ ) beschrieben.

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \sqrt{\frac{\epsilon_1}{\epsilon_2}} = \frac{n_1}{n_2} \quad (2.11)$$

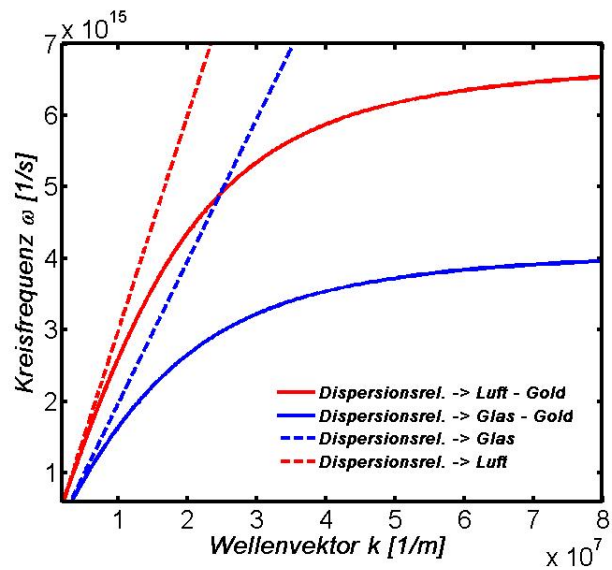
Bei der Brechung entsteht unter der Bedingung  $\sin \beta_g = \frac{n_2}{n_1}$  ein kritischer Winkel, bei dem alles Licht reflektiert wird. Dieser Winkel wird erreicht, wenn  $n_1 > n_2$  und  $\beta$  groß genug ist und damit  $\sin \alpha > 1$  werden müsste, wird in diesem Fall die einkommende Welle an der Grenzfläche reflektiert. Tritt dieser Fall auf, entsteht an der Grenzfläche beider Medien eine evaneszente Welle. Die Ausbreitungsrichtung einer Welle kann über den Wellenvektor  $k$  wie folgt beschrieben werden:

$$\vec{k} = |\vec{k}| = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\epsilon} \quad (2.12)$$

Die evaneszente Welle propagiert entlang der Oberfläche und ihre Amplitude fällt exponentiell im Medium ab. Zur Erzeugung eines Oberflächenplasmonpolaritons muss die evaneszente Welle mit dem Oberflächenplasmon koppeln. Dazu müssen allerdings verschiedene Bedingungen erfüllt sein. Diese Bedingungen lassen sich anhand der Dispersionsrelation (Gl. 2.13) erläutern, die die Ausbreitung einer Welle in einem Medium beschreibt. Diese stellt den Zusammenhang zwischen der Kreisfrequenz  $\omega = 2\pi c/\lambda$  und dem Wellenvektor  $k$  dar.



(a)



(b)

Abb. 2.1: (a) Wellenvektoren an den Grenzflächen (b) Dispersionsrelation der Grenzflächen

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}} \quad (2.13)$$

Aufgrund der komplexen dielektrischen Funktion von Metallen ergibt sich an den Grenzflächen eine Dispersionsrelation, wie sie in Abb. 2.1(b) dargestellt ist (siehe Glg. 2.13).

Die Dispersionsrelation konvergiert an der Grenzfläche gegen die Oberflächenplasmonen-Frequenz und erzeugt in diesem Fall an der Oberfläche ein elektrostatisches Feld, das mit der Frequenz des Oberflächenplasmons schwingt (Glg. 2.14). Diese Plasmonenresonanzen können nur bei der Erfüllung bestimmter Randbedingungen entstehen, können diese zum einen in 2D-Geometrien zu Oberflächenplasmonen-Resonanzen (Surface Plasmon Resonance - Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)) führen. Zum anderen können Partikelplasmonen-Resonanzen (Localised Surface Plasmon Resonance - lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR)) auch in kleinen 3D-Objekten auftreten. Anhand der Oberflächenplasmonenresonanzen lässt sich sehr gut das prinzipielle Verhalten der Plasmonenresonanzen erklären.

$$\omega_{SPP} = \frac{\omega_P}{\sqrt{1 + \epsilon_D}} \quad (2.14)$$

Bei Betrachtung der Dispersionsrelation für Glas und Luft (Abb. 2.1, Glg. 2.13) wird offensichtlich, dass diese keinen Schnittpunkt mit deren jeweiligen Dispersionsrelationen haben und somit auch nicht wechselwirken können. Das bedeutet, dass Licht nicht direkt an einer Oberfläche ein Oberflächenplasmon-Polariton erzeugen kann. Wie aber aus Abb. 2.1(a) deutlich hervorgeht, gibt es im Fall der Totalreflexion einen Wellenvektoranteil der evaneszenten Welle in Richtung des Wellenvektors des Oberflächenplasmons. Dieser einfallende Wellenvektor muss gleich dem Wellenvektor des Oberflächenplasmons sein und in denselben Ebenen schwingen wie das Oberflächenplasmon (TM-Polarisation), damit das Plasmon und die einfallende Welle miteinander koppeln können. Aber auch in diesem Fall gibt es noch keinen Schnittpunkt beider Dispersionsrelationen. Um diesen Schnittpunkt zu erzeugen, stehen zwei prinzipielle Anordnungen zur Verfügung, die in Abb. 2.2 dargestellt sind. Diese Anordnungen wurden von Andreas Otto<sup>[11]</sup> und Erwin Kretschmann<sup>[12]</sup> zur Bestimmung optischer Konstanten entwickelt. Beide ermöglichen eine Generierung von Oberflächenplasmonen-Polaritonen dadurch, dass sie die evaneszente Welle von der Grenzfläche der Totalreflexion auf eine Luft-Gold-Grenzfläche übertragen und somit einen Schnittpunkt in der Dispersionsrelation erzeugen (siehe Abb. 2.1(b)). Dabei ist es wichtig, dass die Amplitude der evaneszenten Welle gerade so stark abgefallen ist, dass diese noch mit dem Oberflächenplasmonpolariton interagieren kann. Bei Otto wird diese Bedingung durch einen Luftspalt realisiert, während Kretschmann den Metallfilm sehr dünn hält. Der eigentliche Messeffekt ist

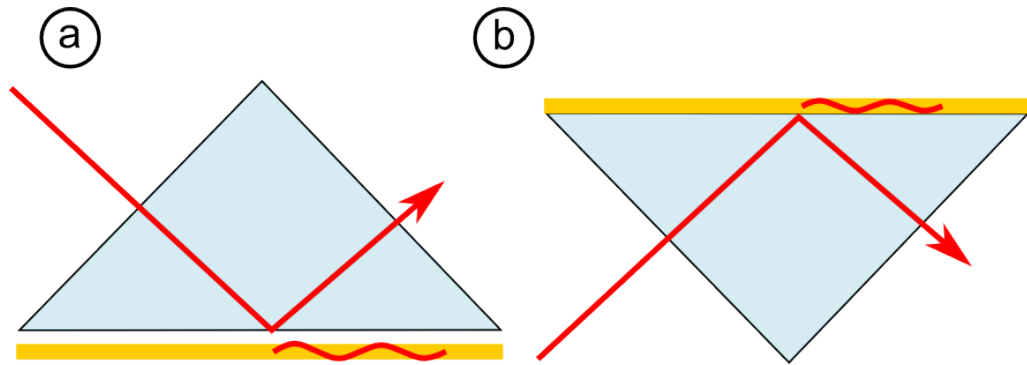


Abb. 2.2: (a) Anordnung nach Otto<sup>[11]</sup> (b) Anordnung nach Kretschmann<sup>[12]</sup>

eine Störung der Totalreflexion an den Grenzflächen beider Medien. Im Falle der Totalreflexion wird ein Verlust an Intensität gemessen, der aus der Einkopplung der evaneszenten Welle in ein Oberflächenplasmonpolariton resultiert. Da der  $k_x$ -Vektor der eingehenden Welle vom einstrahlenden Winkel abhängt, tritt der Verlust der Intensität nur in einem schmalen Bereich auf. Dieser Effekt lässt

sich auf die geometrische Anordnung und damit auch auf die Randbedingungen an den Grenzflächen zurückführen. Daher ist er auch von den Dielektrizitätskonstanten der beteiligten Medien abhängig. Wird diese Änderung in Abhängigkeit vom Winkel des reflektierten oder einfallenden Lichts gemessen, so wird von Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektroskopie gesprochen.

### Lokalisierte Oberflächenplasmonenpolaritonen

Lokalisierte Oberflächenplasmonenpolaritonen sind im Gegensatz zu den Oberflächenplasmonen an eine Nanostruktur gebunden, das heißt sie sind lokalisiert. Dies tritt zum Beispiel in Goldnanopartikeln auf wie sie auch in der Hybridnanostruktur verwendet werden. Die lokalisierten Oberflächenplasmonenpolaritonen (LSP) lassen sich gut anhand der von Gustav Mie formulierten Theorie<sup>[6]</sup> zur Streuung und Absorption von Licht an Goldnanopartikeln beschreiben. Die Theorie von Mie eignet sich vor allem deshalb, weil sie eine komplette analytische Lösung liefert und es zudem erlaubt, die Streuung einer Nanopartikelkugel über zwei Koeffizienten zu berechnen und dabei die verschiedenen Einflusparameter zu berücksichtigen, um entsprechend gezielt die passende Nanostruktur auswählen zu können. Auch hier entstehen Oberflächenplasmonenpolaritonen, die allerdings auf Grund der Geometrie direkt angeregt werden können. Bei der Berechnung wird von einer ebenen Welle ausgegangen, die auf ein Partikel trifft (siehe Abb. 2.3).

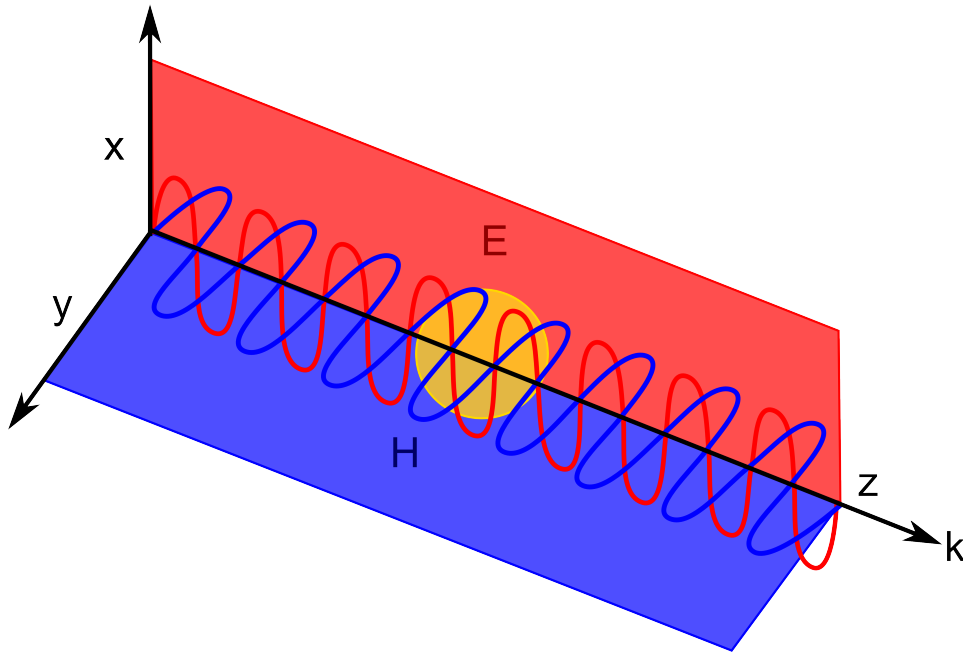


Abb. 2.3: Einfallende ebene Welle, die auf ein Partikel trifft

Ausgehend von den Maxwell-Gleichungen mit der elektrischen Feldstärke  $E$  und der magnetischen Feldstärke  $H$  für eine ebene linear polarisierte Welle, die an einem Partikel gebrochen wird und dabei ein nicht leitendes Medium durchläuft, ergeben sich mit Hilfe der Zeitabhängigkeit  $e^{-i\omega t}$  folgende Gleichungen:<sup>3</sup>

$$\nabla \times H = -k_1 E \quad (2.15)$$

$$\nabla \times E = k_2 H \quad (2.16)$$

<sup>3</sup>Alle Gleichungen und Herleitungen sind in Born, Wolf Kap. 14.5 zu finden.<sup>[9]</sup>

mit den Wellenvektoren

$$k_1 = \frac{i\omega}{c}(\epsilon' + \epsilon'') \quad (2.17)$$

$$k_2 = \frac{i\omega}{c} \quad (2.18)$$

Um dieses Problem lösen zu können, werden die Maxwell-Gleichungen in sphärische Koordinaten transformiert. Aus dieser Transformation und unter Berücksichtigung der Randbedingungen ergibt sich eine zeitfreie Wellengleichung, die mit Hilfe der Debye-Potentiale dargestellt werden kann.

$$\nabla^2 \Pi + k^2 \Pi = 0 \quad \text{mit } k^2 = -k_1 k_2 \quad (2.19)$$

Diese Gleichung lässt sich durch die Verwendung eines Separationsansatzes mit den Ansatzfunktionen  $R(r)$ ,  $\Theta(\theta)$ ,  $\Phi(\phi)$  wie folgt lösen:

$$\Pi = R(r)\Theta(\theta)\Phi(\phi) \quad (2.20)$$

Die Funktionen beschreiben die unterschiedlichen Anteile der elektromagnetischen Welle, welche mit dem Partikel interagiert, in Kugelkoordinaten. Mie und Debye kamen fast zeitgleich, aber unabhängig voneinander, zu einer Lösung des Problems. Heute wird das Ergebnis gebräuchlicherweise über die Debye-Potentiale ( $\Pi$ ) ausgedrückt. In dieser Arbeit wird dabei die mathematische Beschreibung verwendet, die E. Born in seinem Buch „Principle of Optics“<sup>[9]</sup> einführt. Daraus ergeben sich vier Gleichungen als Ansätze für die Lösungen: jeweils eine für elektrische (e) und magnetische Moden (m) sowie für das Feld im Kugellinneren (i) und das äußere Feld (s) der Kugel. Die Lösungen werden dann über Legendre-Funktionen  $P_L^1(\cos \theta)$  dargestellt:

$$r\Pi_i^e = \frac{1}{k_j^2} \sum_{L=1}^{\infty} c_L \psi(k_a r) P_L^1(\cos \theta) \cos \phi \quad (2.21)$$

$$r\Pi_i^m = \frac{1}{k_j^2 k_{2i}} \sum_{L=1}^{\infty} d_L \psi(k_i r) P_L^1(\cos \theta) \sin \phi \quad (2.22)$$

$$r\Pi_s^e = \frac{1}{k_a^2} \sum_{L=1}^{\infty} a_L \zeta(k_a r) P_L^1(\cos \theta) \cos \phi \quad (2.23)$$

$$r\Pi_s^m = \frac{1}{k_a^2 a_{2a}} \sum_{L=1}^{\infty} a_L \zeta(k_a r) P_L^1(\cos \theta) \sin \phi \quad (2.24)$$

Diese Gleichungen sind die eigentliche Lösung der oben genannten Differentialgleichung. Mit den Randbedingungen an der Kugeloberfläche lassen sich zwei Koeffizienten ( $a_L$ ,  $b_L$ , siehe Gl. 2.25 und Gl. 2.26) ableiten, mit denen es möglich ist, die Streuung für eine Kugel zu berechnen. Diese Koeffizienten beinhalten die Material- und Formparameter und stellen damit die Kopplung zwischen Partikel und Medium dar. Mit diesen Koeffizienten lassen sich sehr einfach die Absorptions- und Streuspektren von Nanopartikeln in Abhängigkeit ihrer Größe, ihres Materials und ihres umgebenden Mediums berechnen. Diese Abhängigkeiten sind für die Bioanalytik von Bedeutung, da sich so die Sensitivität und die Reaktion auf Änderungen in der lokalen Umgebung analytisch beschreiben lassen.

Die beiden Koeffizienten<sup>[10]</sup> ( $a_L$  und  $b_L$ ) ergeben sich zu:

$$a_L = \frac{m\psi_L(mx)\psi'_L(x) - \psi'_L(mx)\psi_L(x)}{m\psi_L(mx)\eta'_L(x) - \psi'_L(mx)\eta_L(x)} \quad (2.25)$$

$$b_L = \frac{\psi_L(mx)\psi'_L(x) - m\psi'_L(mx)\psi_L(x)}{\psi_L(mx)\eta'_L(x) - m\psi'_L(mx)\eta_L(x)} \quad (2.26)$$

$$\text{mit } m = \frac{n_{Metall}}{n_{Medium}}, \quad x = |k|R$$

Die Koeffizienten  $a_L$  und  $b_L$  sind die Koeffizienten der gestreuten Welle, neben denen es außerdem noch die Koeffizienten für die Welle im Inneren gibt. Diese ergeben sich aus den Übergangsbedingungen für die Felder an der Kugeloberfläche und korrespondieren mit den Schwingungsmoden des Partikels. Der Koeffizient  $a_L$  ist eine Funktion der elektrischen Moden, während  $b_L$  mit den magnetischen Moden zusammenhängt. Die Materialdaten werden durch den Radius  $R$ , den komplexen Brechungsindex  $n_{\text{Metall}} = \sqrt{\epsilon_{\text{Metall}}}$ , den realen Brechungsindex des Mediums  $n_{\text{Medium}}$  und den Wellenvektor  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$  erfasst. Die Funktionen  $\psi_L$  und  $\eta_L$  sind Ricatti-Bessel-Funktionen und beschreiben die Feldverteilung. Mit diesen Größen lässt sich das Verhalten des Partikels berechnen. Eine interessante Eigenschaft, die sich aus der Verteilung der berechneten Streuung ergibt, ist die Vorzugsrichtung der Streuung bei großen Partikeln. In Abb. 2.4 ist die Richtungsverteilung von Silberpartikeln unterschiedlicher

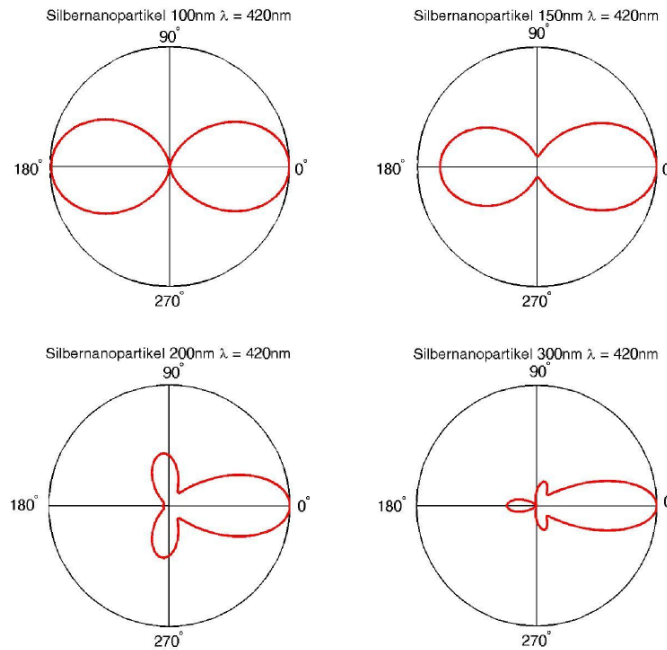


Abb. 2.4: Radiale Verteilung der Streuung in Abhängigkeit der Partikelgröße

Größe für die parallele Polarisierung als Beispiel dargestellt. Es zeigt, wie stark die Geometrie der Nanostrukturen deren optisches Verhalten beeinflusst. Dabei wird deutlich, dass bei steigendem Durchmesser der Partikel zunehmend in Vorwärtsrichtung gestreut wird. Da aber dieser Effekt erst bei einer Partikelgröße größer 100 nm auftritt, liegt für die in dieser Arbeit verwendeten Partikel mit Größen zwischen 30 nm und 100 nm immer eine Dipol-Streucharakteristik vor. Diese Streucharakteristik entsteht aufgrund höherer Moden, die im Partikel angeregt werden und sich dann überlagern.

Anschließend lässt sich über den Poynting-Vektor eine einfache Formel zur Berechnung des Extinktionskoeffizienten ableiten. Der Poynting-Vektor beschreibt dabei den Energietransport der gestreuten Welle und wird aus der elektrischen und magnetischen Feldstärke ( $E$ ,  $H$ ) berechnet ( $S = E \times H$ ). Mit der Formel für den Extinktionskoeffizienten lassen sich effizient die Spektren einzelner Nanopartikel berechnen. Die Streu-, Absorptions- oder Extinktionskoeffizienten können dabei zur Berechnung des Streu- oder Absorptionsquerschnitts herangezogen werden. Die Streuquerschnitte beschreiben die optischen Eigenschaften eines einzelnen Partikels. Durch Superposition kann auch ein

Ensemble von Nanopartikeln ermittelt werden. Dadurch ist es möglich, verschiedene Parameter wie die Extinktion einer Partikellösung, dass heißt, die Summe aus Streuung und Absorption, zu berechnen.

$$\sigma_{Extinktion} = \frac{2\pi}{|k|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) \Re(a_L + b_L) \quad (2.27)$$

$$\sigma_{Streuung} = \frac{2\pi}{|k|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) (|a_L|^2 + |b_L|^2) \quad (2.28)$$

Der Unterschied zwischen den lokalisierten Oberflächenplasmonen-Polaritonen (3D-Geometrie) und den zuvor beschriebenen Oberflächenplasmonen-Polaritonen (2D-Geometrie) liegt vor allem in der Anregung der Plasmonen. Während sich die Oberflächenplasmonen in Goldschichten nicht direkt anregen lassen, sind die kollektiven Schwingungen, also die lokalisierten Plasmonen-Polaritonen, direkt anregbar. Das macht sich z. B. durch die leuchtende Farbe der Metallnanopartikellösungen bemerkbar. Dieser Effekt kann daher auch messtechnisch genutzt werden, indem die spektrale Verschiebung gemessen wird, die bei der Änderung des Brechungsindex des Mediums entsteht. Eine solche Änderung kann entweder global durch unterschiedliche Brechungsindizes der Medien oder lokal durch die Anbindung von Molekülen mit hohen Brechungsindizes an einer Oberfläche induziert werden. Für die Bioanalytik ergeben sich damit vielfältige Einsatzmöglichkeiten.

### Extraordinäre optische Transmission und Nanoholes

Neben den grundlegenden plasmonischen Strukturen wie z. B. Kugeln und Goldschichten gibt es noch weitere Nanostrukturen mit interessanten optischen Eigenschaften. Für die Bioanalytik sind aber nun gerade diejenigen Strukturen interessant, die eine Detektion von sehr wenigen Molekülen erlauben. Für die optische Detektion sind daher in diesem Anwendungsbereich insbesondere Nanoholes geeignet, wie im folgenden Abschnitt gezeigt werden soll. Nanoholes, wie Löcher im Nanometerbereich in dieser Arbeit genannt werden, zeigen optische Eigenschaften, die für analytische Messungen genutzt werden können und bieten zusätzlich die Möglichkeit einer starken Miniaturisierung. Daneben werden Strukturen wie die Nanoholes auch für andere Bereiche erforscht, zum Beispiel im Zusammenhang mit Metamaterialien. Die spezielle Eigenschaft von Metamaterialien besteht in ihrem negativen Brechungsindex, der nur durch eine geeignete Materialkomposition sowie eine definierte geometrische Nanostruktur entsteht.<sup>[13,14]</sup> Plasmonische Nanostrukturen können aber nicht nur im optischen Bereich eingesetzt werden. Auch im Terahertzbereich nehmen diese Strukturen eine immer größer werdende Rolle ein. Für diese Arbeit sind jedoch Strukturen von besonderer Bedeutung, die als Biosensoren für die Bioanalytik eingesetzt werden können.

Erste Untersuchungen zur Transmission elektromagnetischer Wellen durch Löcher mit einem Durchmesser kleiner als die Wellenlänge des einfallenden Lichts wurden von Bethe<sup>[15]</sup> bereits im Jahre 1944 durchgeführt. Die Berechnungen von Bethe kamen zu dem Ergebnis, dass bei derart kleinen Löchern nur eine sehr kleine Transmission zu erwarten ist. Die Grenzwellenlänge wurde mit  $\lambda/2$  abgeschätzt. Erst als 1998 Ebbesen<sup>[16]</sup> und seine Mitarbeiter eine erhöhte Transmission durch einen mit einem Nanoholearray versehenen Silberfilm gemessen haben, nahm das Interesse an Nanoholes zu. Der gemessene Effekt wurde extraordinäre optische Transmission (Extra Ordinary Transmission (EOT)) genannt. Dabei wurde für ein Feld aus Nanoholes mit Durchmessern von ca. 150 nm eine gegenüber Berechnungen früherer Theorien um den Faktor zwei höhere Transmission in der 0.-Ordnung festgestellt. Die ersten theoretischen Beschreibungen wurden wenig später veröffentlicht, wobei vor allem die Rolle von Oberflächenplasmonen,<sup>[17–20]</sup> die Gitterkopplung des Lichtes<sup>[20–22]</sup> und der Einfluss verschiedener Materialien<sup>[23]</sup> untersucht wurde. Insbesondere die theoretische Beschreibung des Effekts

der erhöhten Transmission wird sehr kontrovers diskutiert. Die ursprüngliche Erklärung basierte auf dem Vorhandensein von Oberflächenplasmonen, die durch die evaneszenten Felder angeregt werden. Popov<sup>[24]</sup> lieferte dazu als Erweiterung eine Berechnung des elektromagnetischen Feldes für ein einzelnes Loch in einem plasmonischen Substrat. Weitere Untersuchungen zur Unterstützung dieser Theorie verwendeten zusätzlich eingebrachte Gitterstrukturen,<sup>[25,26]</sup> die durch die propagierenden Oberflächenplasmonen wie ein zusätzlicher Verstärker wirken. Chang<sup>[27]</sup> betrachtete die Anregung lokalisierter Oberflächenplasmonen für einzelne Nanoholes sowie die Anordnung mehrerer Nanoholes in einem Gitter. Dieses optische Verhalten der Oberflächenplasmonen wird mit dem Modell der Fanoresonanzen erklärt.

Ein anderer Ansatz ist die Betrachtung der Beugung von evaneszenten Wellen. Hier wurde das „Composite Diffracted Evanescent Wave“-Modell (CDEW)<sup>[21]</sup> vorgeschlagen. Dabei wird davon ausgegangen, dass, ähnlich wie im Fall der Oberflächenplasmonen, durch die Geometrie bedingt parallel zur Oberfläche evaneszente Wellen entstehen, die sich verstärken oder auslöschen können. Anhand dieser Betrachtungsweise können ähnliche Effekte in nicht plasmonischen Materialien wie Nichtleitern oder Metallen wie Chrom und Aluminium erklärt werden. Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen,<sup>[28–31]</sup> dass zur Erklärung der extraordinären optischen Transmission zahlreiche Faktoren eine Rolle spielen und insbesondere die konkrete Situation betrachtet werden muss. So wurden Nanoholestrukturen unter verschiedenen Aspekten wie z. B. deren Nahfeldeigenschaften,<sup>[32]</sup> die Eigenschaften unter Nutzung ultrakurzer Laserpulse<sup>[33]</sup> oder das Zusammenspiel mit anderen Nanostrukturen<sup>[34]</sup> analysiert.

Aus diesen Untersuchungen ergeben sich für diese Strukturen unterschiedliche Anwendungsbereiche, unter anderem für die strukturierte Beleuchtung in Mikroskopen<sup>[22]</sup> oder als Substrat für die oberflächenverstärkte Ramanspektroskopie.<sup>[35]</sup> Applikationen zur Anwendung der Nanoholes in der Bioanalytik werden im Kapitel 2.2.4 beschrieben. Diese Nanostrukturen eignen sich besonders für die SPR-Spektroskopie oder den Einsatz als LSPR-Sensoren zur sensitiven Detektion von Biomolekülen wie zum Beispiel DNA.

## 2.2 Grundlagen und Begriffe der Bioanalytik

Für die Bioanalytik ist sowohl der Bereich der Biochiptechnologie als auch der Bereich der Biosensoren von großer Bedeutung. Um diese beide Bereiche voneinander abgrenzen zu können, werden die Begriffe in diesem Abschnitt definiert und erläutert.

### 2.2.1 Der Begriff Biosensor

Ein Biosensor<sup>[36]</sup> ist ein aus einem molekularen Erkennungselement und einem Signalwandler bestehendes Bauteil. Das molekulare Erkennungselement ist dabei fest an den Signalwandler gebunden. Das wesentliche Merkmal von Biosensoren besteht darin, dass sich durch eine spezifische biochemische Reaktion am Erkennungselement das Ausgangssignal am Signalgeber verändert. Das Erkennungselement reagiert dabei nur mit festgelegten Bindungspartnern, was einen genauen Nachweis der Analyten ermöglicht. Wie in Abb. 2.5 dargestellt ist, decken die Effekte, die zur Signalwandlung genutzt werden können, das komplette Spektrum physikalischer Effekte ab.<sup>[37]</sup> So gibt es sowohl elektrische, thermische als auch optische Biosensoren, die chemische Reaktionen an Enzymen, Antikörpern oder DNA mit den verschiedenen Analyten (z. B. Proteine und DNA) detektieren.



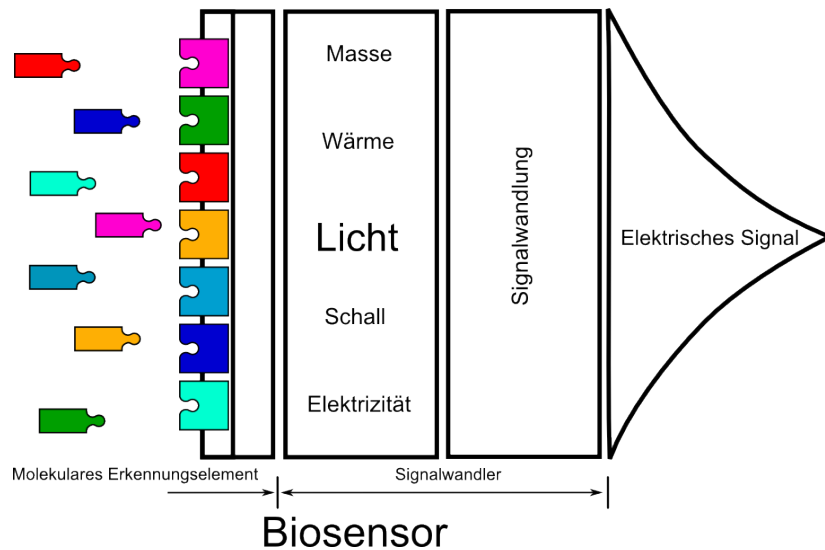


Abb. 2.5: Allgemeines Schema eines Biosensors

Die ersten Biosensoren entstanden bereits in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts und dienten der Detektion von Glukose. Pionier auf diesem Gebiet war Leland Clark, der als erster einen Biosensor<sup>[38]</sup> für Glukose entwickelte. Seitdem wurden zahlreiche Sensoren mit sehr unterschiedlichen Wirkprinzipien entwickelt. Während die ersten Biosensoren noch aus großen elektrochemischen Elektrodenanordnungen bestanden, sind heute Biosensoren im Mikro- und Nanometermaßstab verfügbar. Die Messwandler reichen von Piezocantilevern für die Mikrogravimetrie<sup>[39]</sup> bis hin zu mikrokalorimetrischen Sensoren, die kleinste Temperaturänderungen messen können. Auch Änderungen der Leitfähigkeit werden für Biosensoren als Signal genutzt.<sup>[40–42]</sup>

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf optischen Sensoren. Neben der photometrischen Detektion, bei der eine Änderung der Farbe detektiert wird, gibt es außerdem die Gruppe der auf Plasmonenresonanz basierenden Sensoren. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Biosensoren untersucht, die eine lokalisierte Oberflächenresonanz besitzen. Dennoch sollen auch andere plasmonische Strukturen in diesem Kapitel vorgestellt werden, um zum einen deren Eigenschaften besser zu verstehen und zum anderen einen Vergleich mit der hier neu entwickelten Hybridnanostruktur ermöglichen zu können.

### 2.2.2 Biochiptechnologie

In der Biochiptechnologie<sup>[43]</sup> wird im Gegensatz zu den Biosensoren mit Markierungen gearbeitet, die magnetisch, optisch oder radioaktiv sein können. Der Nachweis einer spezifischen Erkennungsreaktion erfolgt anhand der Detektion der Position, an der das Fängermolekül gebunden hat.

Die Anordnung der Fängermoleküle auf der Oberfläche erfolgt meist im Microarrayformat. Microarrays sind zweidimensionale Plattformen, auf denen Bioreaktionen nachgewiesen werden können. Diese Technologie etablierte sich in den 1990er Jahren, um Expressionsanalysen von Genen mit höherer Effizienz und höherem Durchsatz durchführen zu können. Die Anfänge reichen jedoch bis in die 1980er Jahre zurück, als das Verhalten von verschiedenen Genen auf unterschiedlichen Oberflächen untersucht wurde.<sup>[44,45]</sup> Nachdem dann erstmalig Fängermoleküle auf festen Oberflächen<sup>[46]</sup> immobilisiert werden konnten, nutzte Schena<sup>[47]</sup> diese Verfahren zur Untersuchung menschlicher Gene. Ein großer Teil der heute in Microarrayform hergestellten Biochips nutzt Fluoreszenzfarbstoffe zur Detektion. Der Begriff Microarray definiert dabei die Größe und die Integrationsdichte der Plattform, die verwendet

wird. Dieser Begriff wird sowohl für die Biochiptechnologie als auch für Biosensoren, die ebenfalls in einem Microarray angeordnet sein können, verwendet. Der wichtigste Unterschied zwischen Biochip und Biosensor besteht in der Signalkette. Während im Biosensor das Signal durch die Reaktion am Signalgeber geändert wird, ist das Signal der markierten Analyten immer vorhanden. Nur durch die Bestimmung des Ortes der Bindung erfolgt der Nachweis der spezifischen Reaktion.

Biomoleküle, für die Biochips und Microarrays realisiert wurden, sind z.B. DNA und Proteine wie z.B. Enzyme und Antikörper. Die in dieser Arbeit verwendeten Nanoholes sind prinzipiell für die Anwendung als Biochip geeignet. Zusätzlich sollte die Größe und Anordnung der Nanoholes als intrinsisches Microarray mit hoher Integrationsdichte dienen.

### 2.2.3 Auslesetechniken in der Biotechnologie

Wie schon in vorherigen Kapiteln erläutert wurde, hängen die Begriffe Biosensor und Biochip eng miteinander zusammen. Hier sollen nun verschiedene Detektionstechniken gezeigt werden, mit denen Biochips oder Biosensoren ausgelesen werden können. Damit soll ein Überblick der gegenwärtigen Entwicklung vermittelt werden, der hilft, das Potential der hier verwendeten Nanoholes einzuschätzen. Die Techniken, mit denen Biosensoren ausgelesen werden können, das heißt, die Variationen möglicher Transducer, sind sehr vielfältig geworden. Dabei stehen immer drei Faktoren im Mittelpunkt: Sensitivität, Spezifität und die Möglichkeit, das System zu miniaturisieren. Diese Anforderungen stehen sich oft konträr gegenüber. Um dennoch eine optimale Lösung zu erreichen, wurde eine Vielzahl verschiedener Ansätze entwickelt. Die Standardtechnologie zur Detektion von Microarrays ist heute die Fluoreszenz. Dabei werden alle Sonden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und anschließend über verschiedene Anregungs- und Detektionsfilter ausgelesen. Die Anzahl der vorhandenen Farbstoffe und die Möglichkeit, kleinste Muster mit Biomolekülen herzustellen, macht diese Technologie zur meistverwendeten kommerziellen Technik. Der Nachteil dieser Methode liegt im Vergleich zur SPR-Technologie beispielsweise darin, dass meist Endpunktbestimmungen vorgenommen werden. Ein Biochip kann daher nur einmal verwendet werden und ein Ergebnis nur nach Ende der Reaktion gemessen werden. Kinetiken der Reaktionen oder gar eine Regeneration des Biochips sind meistens nicht vorgesehen. Ein weiteres Problem besteht in der Instabilität der Fluoreszenzfarbstoffe, die mit der Zeit z. B. durch Bleaching an Intensität verlieren. Als Vorteile sind der hohe Durchsatz und die Möglichkeit der schnellen Messung aufzuführen.

Neben vielen weiteren Techniken gibt es die Möglichkeit, Biosensoren und Biochips elektrisch auszulesen. Dafür wurden verschiedene Varianten entwickelt. Eine Möglichkeit ist der elektrische DNA-Chip, bei dem nach der Anbindung der mit Goldnanopartikeln modifizierten Sonden Silber spezifisch an diesen Nanopartikeln abgeschieden wird.<sup>[48,49]</sup> Dadurch entsteht eine leitfähige Schicht. Die Leitfähigkeit dieser Schicht kann einfach über den elektrischen Widerstand gemessen werden. Durch mikrostrukturierte Chips kann eine große Anzahl verschiedener Moleküle analysiert werden und in einem Lab-on-a-Chip-Design vor Ort getestet werden.

Die Nutzung optischer Signale, neben der Fluoreszenz, ist ebenfalls von großem Interesse für die Biosensorik. Dabei wird versucht, die intrinsischen Nachteile von Fluoreszenzfarbstoffen wie Photobleaching oder die schlechte quantitative Auswertung zu umgehen. Als vielversprechende optische Marker haben sich unter anderem Quantendots und plasmonische Nanopartikel erwiesen. Quantendots sind Nanopartikel, die aus Halbleitermaterialien bestehen. Diese zeigen eine starke Fluoreszenz, ohne zu bleichen. Der Nachteil der Quantendots liegt jedoch in der hohen Toxizität der verwendeten Materialien.

Edelmetallnanopartikel liefern ebenfalls ein starkes optisches Signal. Je nach verwendetem Metall weisen diese jedoch im Gegensatz zu den Quantendots keine oder nur eine geringe Toxizität auf. Optische Signale lassen sich dabei durch Mikroskopie oder Spektroskopie und zum Teil sogar mit bloßem Auge beobachten. Diese optischen Signale lassen sich nicht nur als Marker für die Biochiptechnologie nutzen, sondern auch für optische Biosensoren, auf die anschließend näher eingegangen werden soll. Neben optischen und elektrischen Messverfahren gibt es weitere Möglichkeiten, um die Anbindung von Biomolekülen zu messen, wie z. B. über Massenzunahme oder mittels akustischer, magnetischer oder kalorimetrischer Nachweisverfahren.

Die in dieser Arbeit verwendeten Nanoholes in Kombination mit Edelmetallnanopartikeln stellen sich der Herausforderung, eine Sensitivität auf dem Level der SPR-Geräte bei gleichzeitig hoher Integrationsdichte an Biosensoren zu erreichen. Schließlich soll das Ausleseverfahren möglichst schnell und einfach sein.

## 2.2.4 Plasmonische Nanostrukturen als Sensoren in der Bioanalytik

Plasmonische Nanostrukturen eignen sich besonders gut als Transducer für Biosensoren. Dabei spielen vor allem die hohe Sensitivität und das starke optische Signal eine Rolle. In diesem Abschnitt wird kurz auf die sensorischen Eigenschaften der SPR-Spektroskopie eingegangen. Zudem sollen die sensorischen Eigenschaften der Nanoholes, die Oberflächenplasmonen als Transducer für den Nachweis von Biomolekülen nutzen, mit denen der LSPR-Systeme verglichen werden.

### Oberflächenplasmonen-Resonanzspektroskopie

Bereits Kretschmann<sup>[12]</sup> wies darauf hin, dass schon dünne Schichten auf der Oberfläche von plasmonischen Schichten zu starken Änderungen im Messsignal führen. Auf dieser Beobachtung begründet sich die Nutzung dieses Effekts für messtechnische Aufgabenstellungen. Dieses häufig in der Biotechnologie angewandte Verfahren misst die Änderung des Brechungsindex an der Grenzfläche beim Anbinden von Molekülen an die Oberfläche.

Dieses Prinzip wurde bereits in den 1980er-Jahren zur Messung dielektrischer Schichten und sogar von Gasen verwendet<sup>[50–52]</sup>. Später wurde diese Methode für biologische Proben genutzt. Aufgrund der stetigen Weiterentwicklung kamen erste kommerzielle Geräte auf dem Markt, die eine Detektion von Erkennungsreaktionen ermöglichten. Damit konnte diese Technik zum Screening verschiedener biologischer Assays eingesetzt werden und bildet heute den Standard für die optische Detektion mittels Sensoren in der Bioanalytik. Heute werden SPR-Geräte kommerziell vertrieben und vor allem in der Pharmaindustrie zum Testen von Wirkstoffen eingesetzt. Der große Vorteil dieser Methode besteht in der hohen Sensitivität bei der Messung von chemischen Reaktionen durch die Kopplung von Oberflächenplasmonen und deren Umgebung. Nachteile bestehen grundsätzlich im Aufbau der Geräte. Beim üblicherweise verwendeten Kretschmann-Aufbau muss die Schichtdicke sehr genau kontrolliert werden, da sonst keine SPP mehr an der Oberfläche entstehen können. Ein weiteres Problem ist die Temperatur, da sich der Brechungsindex der meisten Flüssigkeiten in Abhängigkeit von der Temperatur deutlich ändert. Daher muss die Temperatur sehr genau geregelt werden. Ein SPR-Spektrometer kann mittlerweile Brechungsindexänderungen von  $\Delta n = 10^{-6}$  detektieren.

## Nanoholes als Biosensoren

Eine Struktur, die SPP unterstützt, ist ein Nanohole-Feld in einem plasmonischen Material. Diese neuen Nanostrukturen stellen ein Bindeglied zwischen den SPR- und den LSPR-Strukturen dar. Die Strukturierung von plasmonischen Oberflächen schafft neue Möglichkeiten für sensitive Biosensoren. Durch die genaue Definition der beiden Parameter Lochdurchmesser und Lochabstand werden gekoppelte plasmonische Strukturen geschaffen, die sich mit ihren definierten spektralen Eigenschaften für zahlreiche Anwendungen in der Bioanalytik eignen. Aktuell werden in diesem Bereich zahlreiche Untersuchungen zur Tauglichkeit dieser Strukturen in der Bioanalytik durchgeführt. Dabei wurde das Applikationspotential für die *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*,<sup>[35]</sup> für die verstärkte Fluoreszenz zur Einzelfluorophor-Detektion<sup>[53]</sup> sowie die Anwendung als Immunbiosensor<sup>[54,55]</sup> untersucht. Es hat sich gezeigt, dass ein einzelnes Nanohole als Verstärker für das Signal eines Fluorophors dienen kann. Mit Hilfe einer Autokorrelation kann die Anzahl der Fluorophore im Loch bestimmt werden.<sup>[56]</sup> Die Verstärkereigenschaften für einzelne Nanoholes können dabei durch zusätzliche Nanostrukturen wie Ringe unterstützt werden.<sup>[25]</sup>

Eine weitere Möglichkeit, Nanoholefelder in der Bioanalytik zu verwenden, ist die Messung der Plasmonenresonanzänderung bei der Anbindung von Molekülen an der Metalloberfläche ähnlich einem SPR-Spektrometer. Dabei werden die Nanoholes über den gesamten Chip gleichmäßig erzeugt. Sie dienen damit gleichzeitig als Verstärker und der Einkopplung für die Messung der Plasmonenresonanz. Der große Vorteil der Nanoholes besteht darin, dass mit ihnen eine unmittelbare Messung der Transmission möglich ist und somit die Verschiebung der Wellenlänge bei der Anbindung von Molekülen<sup>[57]</sup> direkt bestimmt werden kann. Die Anwendung von Nanoholes aus plasmonischen Materialien zeigt Potential für zukünftige Anwendungen im Bereich der Bioanalytik. Ausgehend von diesem Punkt ist die Entwicklung kleinerer plasmonischer Strukturen für die Bioanalytik notwendig. Der nächste Schritt ist die Verwendung von Nanostrukturen mit lokalisierter LSPR anstatt der bisher verwendeten SPR.

## Biosensoren mit lokalisierter Oberflächenplasmonen-Resonanz (LSPR)

Für die Bioanalytik sind auch Nanostrukturen mit LSPR von großem Interesse. Diese Strukturen besitzen einige Vorteile gegenüber den bisher beschriebenen Strukturen mit SPR. Eine kleine Oberfläche, auf der nur eine geringe Anzahl von Molekülen anbinden kann sowie die hohe Sensitivität als Änderung der Ausgangsgröße bezogen auf die Änderung der Eingangsgröße<sup>4</sup> einzelner plasmonischer Nanostrukturen, macht diese Strukturen für bioanalytische Messungen interessant. Mit diesen Strukturen können sehr geringe Konzentrationen von Analyten nachgewiesen werden. Gerade Edelmetallnanopartikel sind ideal zur Detektion von nur wenigen Molekülen. Sensoren, die auf LSPR basieren, können auf unterschiedliche Arten verwendet und hergestellt werden. So gibt es, Messsysteme bei denen sowohl die einzelnen Reaktionsschritte als auch deren optische Messung an einem Ensemble von Partikeln stattfinden. Dabei werden die Partikel mit Biomolekülen wie zum Beispiel DNA versehen und die Anbindung der Fängersequenz spektral beobachtet. Auf diese Weise wird immer ein Ensemble, also eine große Anzahl von Partikeln, gleichzeitig gemessen und somit auch zeitgleich die spektrale Verschiebung vieler Partikel. Dem gegenüber lassen sich auch einzelne Partikel auf Oberflächen sichtbar machen und entsprechend einzeln vermessen. Durch die Messung einzelner Partikel lässt sich die Sensitivität erhöhen und die Nachweisgrenze verringern. Dabei werden sehr unterschiedliche Strukturen erzeugt und hinsichtlich ihrer sensorischen Eigenschaften untersucht. Die

<sup>4</sup>Sensitivität in diesem Fall:  $S = \frac{d\lambda}{dn}$

Sensitivität hängt von zwei Faktoren ab: von der Form der Nanopartikel und von deren Material. Dabei zeigte sich, dass vor allem anisotrope Formen (z. B. Stäbchen oder Dreiecke) eine höhere Sensitivität besitzen als isotrope Formen wie Kugeln.<sup>[58]</sup> Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Sensitivität ist die Verbindung mehrerer Nanopartikel, um so einen neuen Sensor zu erhalten. Durch die Kombination mehrerer Nanopartikel entstehen neue Resonanzen, die das Spektrum zumeist in Richtung Infrarot verschieben.<sup>[59,60]</sup> Dadurch weisen sie eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Änderungen im lokalen Brechungsindex auf.

## 2.3 Herstellungsstrategien für Nanoholes und Hybridnanostrukturen

Neben der Herstellung von Nanostrukturen mittels etablierter Technologien der Halbleiterindustrie werden auch alternative Ansätze zur Herstellung von Nanostrukturen erforscht. Diese Technologien sollen eine hohe Genauigkeit bei der Herstellung kleinster Strukturen besitzen und zudem schnell und kostengünstig produziert werden können. Hier sollen zwei Methoden für die Herstellung von Nanoholes vorgestellt werden, die im Rahmen dieser Arbeit als alternative Herstellungsmethoden betrachtet wurden. Der Top-Down-Ansatz soll anhand der *Focused-Ion-Beam*-Herstellung (FIB) vorgestellt werden, die Bottom-Up-Methode anhand der sogenannten Colloidal Lithography - Lithographie mittels Mikropolymerkugeln (CL). Die Erkenntnisse dieser Betrachtungen fließen in den Herstellungsprozess der neuartigen Hybridnanostruktur ein, für deren Herstellung, wie später noch gezeigt wird, sowohl ein Top-Down- als auch ein Bottom-Up-Prozessschritt notwendig ist.

### 2.3.1 Focused Ion Beam

Mit Hilfe eines fokussierten Ionenstrahls (FIB) lassen sich sehr kleine Strukturen sehr präzise herstellen.<sup>[61,62]</sup> Dabei werden Gallium- oder Helium-Ionen mit Hilfe von elektrischen Feldern so fokussiert, dass auf der Zieloberfläche ein Punkt kleiner 5 nm entsteht. Aufgrund der hohen Energie der beschleunigten Teilchen können diese Material an der Oberfläche abtragen. Dabei werden Genauigkeiten von bis zu 5 nm erreicht.

### 2.3.2 Elektronenstrahlolithographie

Ein Ziel bei der Herstellung von Nanoholes ist es, eine große Anzahl von Proben mit gleichen Eigenschaften zu produzieren. Hierfür hat sich die Elektronenstrahlolithographie (EBL) als die Methode der Wahl herausgestellt, da sich damit sehr kleine Strukturen effektiv erzeugen lassen.

Bei der EBL wird mit Hilfe eines Elektronenstrahls eine Struktur punktweise in einen Photolack geschrieben. Durch den Elektronenstrahl werden dabei die Polymerketten im Photolack zerstört. Diese zerstörten Ketten werden im nächsten Schritt bei der Entwicklung des Photolacks herausgelöst und es entsteht ein Negativ der herzustellenden Struktur. Die eigentliche Struktur wird letztlich durch das Auf- bzw. Abtragen von Material erzeugt.

### 2.3.3 Herstellung von Nanoholes durch Colloidal Lithography

Nanostrukturen können auch über das Verfahren der Colloidal Lithography<sup>[63,64]</sup> hergestellt werden. Diese Methode besteht aus zwei Prozessschritten. Zunächst werden Polystyrolkugeln auf einem Substrat immobilisiert. Die Kugeln wirken dabei wie ein Negativ der zu erzeugenden

Nanostruktur. Anschließend erfolgt das Aufdampfen einer Metalloberfläche wie bei einem normalen Lithographieschritt. Die Kugeln schützen dabei den Bereich auf dem Substrat, den sie abdecken. Zuletzt werden die Polystyrolkugeln wieder entfernt und zurück bleibt eine nanostrukturierte Oberfläche. Diese Bottom-Up-Methode lässt sich einfach für verschiedene Oberflächen realisieren, ohne dass die große Anzahl an Prozessschritten aus der Halbleiterlithographie von Nöten ist. Die Colloidal Lithography bietet die Möglichkeit, Nanostrukturen mit geringem Aufwand in verschiedenen Materialien herzustellen. Die Nachteile dieser Methode liegen allerdings in der schlecht kontrollierbaren Geometrie einzelner Strukturen und der geringen Anzahl an Freiheitsgraden bei der Herstellung. Dennoch können damit Strukturen kleiner 100 nm sehr einfach und effizient realisiert werden.

Der wichtigste Schritt der Colloidal Lithography ist die Immobilisierung der Polystyrolkugeln. Die Größe der Kugeln und deren Dichte auf der Oberfläche bestimmen die Eigenschaften der entstehenden Nanostruktur. Werden die Kugeln sehr dicht gepackt, gelangt das Metall nur in den kleinen Zwischenräumen zwischen den Kugeln an die Oberfläche. Nach der Entfernung der Kugeln befinden sich kleine Dreiecke in hexagonaler Anordnung auf der Oberfläche.<sup>[65]</sup> Solche Strukturen werden zum Beispiel für die oberflächenverstärkte Ramanstreuung (SERS) genutzt.<sup>[66]</sup> Eine andere Möglichkeit ist die Erzeugung von Nanoholes. Dabei werden die Kugeln weit über die Oberfläche verstreut. Mit dem Entfernen der Kugeln entstehen an deren Stelle einzelne Nanoholes.<sup>[67]</sup> Um die Anzahl möglicher Strukturen über Sterne und Löcher hinaus zu erweitern, werden Prozessschritte in die Colloidal Lithography eingebaut, die mehr Freiheitsgrade erlauben. Dazu zählen Schritte wie Plasmaätzen,<sup>[68]</sup> UV-Bestrahlung, FIB-Strukturierung<sup>[69,70]</sup> oder die Verwendung mehrerer Kugellayer.

Zur gezielten Immobilisierung der Polystyrolkugeln werden verschiedene Verfahren der Selbstassemblierung genutzt. Dabei ist es sehr wichtig, die Polystyrolkugeln so zu assemblieren, dass über einen weiten Bereich eine möglichst geordnete Struktur entsteht. Kräfte wie die van-der-Waals-Kraft, elektrostatische Kräfte (Coulombkraft) und mechanische Kräfte beeinflussen dabei die Immobilisierung. Mit der gezielten Beeinflussung dieser Kräfte lässt sich die Immobilisierung und damit auch die entstehende Nanostruktur steuern.<sup>[71,72]</sup> Dies kann beispielsweise über die Methode des „dip-coating“ erfolgen. Dabei wird ein Tropfen mit Partikeln auf einer Oberfläche eingetrocknet und die Verdunstungsrate kontrolliert.<sup>[73–75]</sup> Der Tropfen wird entweder komplett eingetrocknet<sup>[76]</sup> oder das Substrat mit Hilfe eines Motors bewegt. Beide Verfahren werden verwendet, um eine sich bewegende Grenzfläche zu schaffen,<sup>[77]</sup> in der die Immobilisierung der Partikel stattfindet. Andere Varianten zur Herstellung von geordneten 2D-Strukturen sind die Langmuir-Blodgett-Technik<sup>[78]</sup> oder die Elektro- oder Dielektrophorese.<sup>[79]</sup> Schließlich soll hier noch das „spin-coating“ Erwähnung finden,<sup>[80]</sup> bei dem die Partikel mit Hilfe der Zentrifugalkraft immobilisiert werden.

Zur Optimierung des Immobilisierungsprozesses können entweder die Konzentration der Partikellösung oder die Benetzungseigenschaften der Oberfläche geändert werden. Obwohl diese Verfahren für die Herstellung von Nanostrukturen mittels Polystyrolkugeln geeignet sind, können sie auch auf die Herstellung neuer Hybridnanostrukturen übertragen werden. Alternativ können die Partikel auch an bereits hergestellten Strukturen immobilisiert oder an selbstordnenden Monolagen zur Steuerung der Immobilisierung verwendet werden. Diese Verfahren werden im nächsten Abschnitt genauer beschrieben, da sie die Basis der Herstellung der Hybridnanostruktur bilden. Bei der Herstellung einzelner Nanostrukturen für sehr sensitive Nachweise muss allerdings beachtet werden, dass diese Strukturen räumlich so weit voneinander zu entfernen sind, dass sie mit einem Mikroskop optisch trennbar wahrnehmbar sind.

### 2.3.4 Integration von Nanopartikeln in Nanoholes durch gesteuerte Selbstassemblierung

Um Hybridnanostrukturen aus Nanopartikeln und Nanoholes zu erzeugen, müssen die Partikel in Nanoholes immobilisiert werden. Dabei sollen die Nanopartikel durch Selbstorganisation in die Nanoholes gelangen. Zur Steuerung dieses Prozesses kommen Methoden der Softlithographie zum Einsatz.<sup>[81]</sup> Unter dem Begriff Softlithography werden verschiedene Bottom-Up-Methoden zusammengefasst, die hauptsächlich auf der Ausnutzung der Eigenschaften von selbstorganisierenden Monolagen basieren.<sup>[82]</sup> Mit Hilfe dieser Monolagen lassen sich gezielt die Oberflächeneigenschaften von Substraten verändern, weshalb sie sich gut zur Herstellung neuer Nanostrukturen eignen. Die Ausnutzung der Monolagen kann prinzipiell auf zwei Wegen erfolgen. Eine Variante besteht in der gezielten Übertragung von Monolagen auf die Oberfläche mittels Nano-Imprinttechnik. Dabei wird ein PDMS-Stempel (Polydimethylsiloxan (PDMS)) erzeugt, mit dem sich Monolagen gezielt übertragen lassen. Mit Hilfe dieser Monolagen lassen sich Nanostrukturen kleiner als 50 nm realisieren. Des Weiteren können alternativ Dummystrukturen (z. B. Oberflächenschichten aus Polymethylmethacrylat) erzeugt werden, in denen sich andere Nanostrukturen assemblieren können. Beide Varianten werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Bei der Übertragung von Monolagen mittels Nano-Imprint spielt die Materialspezifität der eingesetzten Monolage eine wichtige Rolle. Durch die Wahl der Kopfgruppe am Ende des Moleküls, das die Monolage bildet, kann eine hohe Affinität zu verschiedenen Materialien erreicht werden.<sup>[82]</sup> So sind zum Beispiel für Goldoberflächen funktionelle Thiol-Gruppen geeignet.<sup>[83–86]</sup> Für die Modifizierung oxidischer Metalloberflächen eignen sich wiederum Monolagen mit Phosphatgruppen.<sup>[87–92]</sup> Solche Modifizierungen können unter anderem dazu dienen, in weiteren Prozessschritten Moleküle z. B. Desoxyribonucleic Acid (DNA) oder andere Nanostrukturen (z. B. Nanopartikel oder Silicapartikel) spezifisch anzubinden. Mit Hilfe verschiedener funktioneller Gruppen lassen sich so Verbindungen zu anderen funktionellen Gruppen herstellen oder die Benetzungseigenschaften verändern. In dieser Arbeit kamen zwei unterschiedliche Kopfgruppen sowie eine funktionelle Endgruppe zum Einsatz. Die Thiol-Gruppe besitzt eine hohe Affinität zu Edelmetallen wie Gold und ist daher zur Anbindung an Goldnanopartikel geeignet. Die verwendete Epoxi-Gruppe ist speziell für die Anbindung an Glasoberflächen geeignet. Als funktionelle Endgruppe für die DNA-Analytik wurde eine Aminogruppe verwendet. Mit diesen verschiedenen Gruppen kann die Verbindung von Molekülen oder Partikeln mit Glasoberflächen realisiert werden.

Neben den Monolagen gibt es noch weitere Möglichkeiten, die Selbstassemblierung von Nanostrukturen zu unterstützen. Eine dieser Möglichkeiten ist die Immobilisierung kleiner funktioneller Nanostrukturen an schon vorher gefertigten Dummystrukturen.<sup>[93–99]</sup> Zur Optimierung des Immobilisierungsprozesses werden diese Template-Strukturen meist in Form und Größe auf die zu immobilisierenden Objekte zugeschnitten. Die Templates selbst werden zum Beispiel per Nano-Imprintlithographie hergestellt.

Um die Objekte zu immobilisieren, wird auf das Verfahren der bewegten Kontaktlinie zurückgegriffen. Die wirkenden Kapillarkräfte fixieren auf diese Weise die Partikel in den Strukturen. Die einfachste Variante eine bewegte Kontaktlinie zu erzeugen, ist die Methode des eintrocknenden Tropfens. Während des Eintrocknens werden die im Tropfen befindlichen Partikel mittransportiert und an der Kontaktlinie immobilisiert. Die Eintrocknung kann auf zwei Arten erfolgen. Die erste Möglichkeit ist das „*pinning*“, bei dem die Kontaktlinie am Substrat festhängt und der Tropfen kontinuierlich an Volumen verliert, ohne dabei seinen Durchmesser zu verändern. Die einsetzende Strömung

transportiert die Partikel in Richtung Rand, wo sie sich vermehrt ablegen. Dieser Effekt wird als Kaffeerandeffekt bezeichnet.

Die andere Möglichkeit ergibt sich aus der Bewegung der Kontaktlinie, da der Tropfendurchmesser während des Trocknungsvorganges abnimmt. Die Partikel werden so zum Rand transportiert, bleiben dort aber nicht liegen, sondern bewegen sich weiter. Trifft eine Kontaktlinie auf eine Struktur, so bleibt die Kontaktlinie dort kurzzeitig hängen und ermöglicht damit die Immobilisierung von Partikeln in der Struktur. Da eine hohe Anzahl von Partikeln innerhalb der Strukturen erwünscht ist und wenige Partikel auf der Oberfläche verbleiben sollen, muss ein Hängenbleiben der Kontaktlinie (*pinning*) vermieden werden. Dieser Effekt wird vor allem von den Oberflächenspannungen an den Grenzflächen zwischen Oberfläche, Luft und Flüssigkeit beeinflusst. Diese Abhängigkeiten können daher genutzt werden, um ganz gezielt Partikel in Ringen anzuordnen.<sup>[100]</sup> Allerdings ist das für die herzustellende Nanostruktur aus Nanopartikeln und Nanoholes nicht sinnvoll, da hier das Template, in das immobilisiert werden soll, bereits durch die Geometrie der Löcher vorgegeben ist.

## 2.4 Hyperspectral Imaging für parallele Sensorauswertung

### 2.4.1 Hyperspectral Imaging

Als Option zur normalen Mikroskopie und Mikrospektroskopie gibt es die hyperspektrale Bildgebung, mit deren Hilfe sich die hier entwickelte Hybridnanostruktur optisch spektral und parallel auswerten lässt. Um möglichst viele optische Informationen parallel sammeln zu können, ist es von Vorteil, eine Farbkamera zu nutzen, die mehr als die drei üblichen spektralen Kanäle Rot, Grün und Blau aufweist. Werden mehr als 8 Farbkanäle verwendet, wird von hyperspektraler Bildgebung gesprochen.

Um zusätzliche spektrale Informationen zu erhalten, kann sehr unterschiedlich vorgegangen werden. Die einfachste Variante ist die Verwendung unterschiedlich empfindlicher Empfänger. Die erhaltenen Signale werden anschließend rechentechnisch überlagert. Diese Methode beschränkt jedoch die Anzahl der möglichen Kanäle stark, da jeweils nur ein Teil des eingestrahnten Lichts den jeweiligen Empfänger erreicht. Eine andere Variante, die eine sehr hohe spektrale Empfindlichkeit aufweist, ist der Einsatz eines Gitterspektrographs in Verbindung mit einem Linienscan.<sup>[101,102]</sup> Dabei wird mit Hilfe eines Spalts ein Teil des Objekts über das Gitter des Spektrometers spektral auf eine CCD-Kamera abgebildet. Die Signale der Objekte im Spalt werden spektral aufgelöst. Durch eine Verschiebung des Spalts wird ein komplettes spektrales Bild aufgenommen. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass zum einen ausgeschlossen werden muss, dass sich mehrere Objekte nebeneinander im Spalt befinden. Zum anderen muss das Objekt oder der Spalt bewegt werden, um ein komplettes hyperspektrales Bild aufzunehmen.

Als Alternative dazu ist der Einsatz von Fourier-Spektrometern zu sehen. Dabei wird durch ein Mikroskop, an das ein Interferometer gekoppelt ist, eine Bilderserie aufgenommen. Anhand des Interferenzmusters jedes Pixels kann dann mittels Fourier-Transformation das jeweilige Spektrum berechnet werden. Bisher wurden Geräte entwickelt, die entweder ein Sagnac-,<sup>[103,104]</sup> Farby-Perot-<sup>[105–107]</sup> oder ein Michelson-Interferometer verwenden. Da sich für mikroskopische Anwendungen die Verwendung eines Michelson-Interferometers besonders eignet, soll im nächsten Abschnitt genauer auf die physikalischen Grundlagen der Fourier-Transformations-Spektroskopie eingegangen werden.



### 2.4.2 Fourier-Transformations-Spektroskopie

Die Fourier-Transformations-Spektroskopie (FT-Spektroskopie) wird vor allem bei der chemischen Analyse von Stoffen eingesetzt. Hauptsächlich wird dabei spektral im mittleren und fernen Infrarot gearbeitet. In diesem Spektralbereich können die Schwingungszustände von Molekülen angeregt und gut detektiert werden. Grundsätzlich kann das Prinzip der FT-Spektroskopie aber auch in anderen Wellenlängenbereichen angewendet werden.

Ausgangspunkt für die Betrachtung der FT-Spektroskopie ist die Interferenz zweier monochromatischer Wellen. Bei der Überlagerung zweier Lichtstrahlen gleicher Wellenlänge entsteht bei einer Phasendifferenz von  $\varphi_0 = 0$  aufgrund der konstruktiven Überlagerung ein Maximum und bei einer Phasendifferenz von  $\varphi_0 = \pi$  eine totale Auslöschung beider Wellen. Das Profil des Interferenzmusters lässt sich über

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda}x\right) \quad (2.29)$$

beschreiben. In diese Formel gehen die Intensitäten  $I_1$  und  $I_2$  der sich überlagernden Strahlen ein sowie ein variabler Teil, der von der Wellenlänge  $\lambda$  der Strahlen und der optischen Wegdifferenz  $x$  abhängig ist. Die optische Wegdifferenz, die beim Aufspalten einer Welle in zwei Teilwellen entsteht, kann dabei auch als Phasenverschiebung der beiden monochromatischen Wellen aufgefasst werden. Werden in einem weiteren Schritt die Teilstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge miteinander überlagert, so entsteht bei  $x = 0$ , also bei gleicher optischer Wegdifferenz, ein Maximum. Mit zunehmender Verschiebung nimmt die Intensität  $I$  ab, da sich durch die unterschiedlichen Wellenlängen die Maxima immer stärker zueinander verschieben (siehe Abb. 2.6). Werden alle Wellenlängen des Lichts überlagert, die auf den Detektor empfangen werden können, so folgt

$$I(x) = \int_{\lambda_{min}}^{\lambda_{max}} I(\lambda) \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda}x\right) d\lambda \xleftrightarrow{FT} I(\lambda) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(x) \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda}x\right) dx \quad (2.30)$$

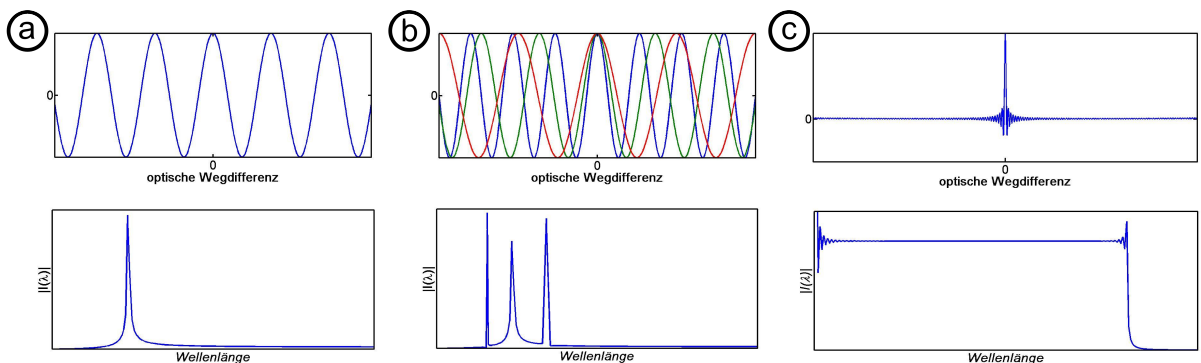


Abb. 2.6: Interferenzen im Ortsraum (oben) und Fouriertransformation (unten): a) monochromatische Interferenz, b) polychromatische Interferenz (im Ortsraum als einzelne Schwingungen dargestellt), c) Weißlichtinterferenz

Dabei bilden  $I(x)$  und  $I(\lambda)$  ein Fourier-Paar, das heißt,  $I(x)$  entspricht der inversen Fourier-Cosinus-Transformation von  $I(\lambda)$  und damit dem Energiespektrum der auf dem Detektor ankommenden Strahlen. Diese Beziehung bildet die Grundlage für die FT-Spektroskopie. Um ein Spektrum messen zu können, muss das einfallende Licht für verschiedene optische Weglängen überlagert werden. Diese Überlagerung kann durch den Einsatz eines Michelson-Interferometers

realisiert werden. Dabei wird der einfallende Lichtstrahl über einen optischen Teiler aufgeteilt und auf einen festen und einen beweglichen Spiegel umgeleitet. Nach der Reflexion an den Spiegeln werden die Strahlen wieder überlagert und auf einen Detektor gebracht. Durch den beweglichen Spiegel lassen sich unterschiedliche optische Gangunterschiede  $x$  einstellen. Im Falle von Weißlicht tritt eine Interferenz in der Nähe des optischen Nulldurchgangs auf. In der Praxis wird dafür eine kontinuierliche Lichtquelle (Weißlicht) mit kurzer Kohärenzlänge genutzt. Das komplette aufgenommene Interferogramm wird dann fouriertransformiert und es entsteht gemäß Glg. 2.30 das wellenabhängige Spektrum des einfallenden Lichtstrahles, welches einfach mittels *Fast-Fourier-Transformation* berechnet werden kann.

Wie in Abb. 2.6 c) zu erkennen ist, führt die Überlagerung von vielen Schwingungen im Zeitbereich zu einem breitbandigen Spektrum im Fourier-Raum, während einzelne überlagerte Schwingungen (Abb. 2.6 b)) zu einzelnen Peaks im Spektrum führen.

Der große Vorteil der FT-Spektroskopie liegt im simplen Aufbau der Anordnung, da keine dispersiven Elemente wie Prismen oder Gitter benötigt werden. Damit lässt sich ein solches Spektrometer einfach in ein Mikroskop integrieren. Der Strahlengang bleibt davon unbeeinflusst, so dass eine spektrale Bildgebung möglich ist.

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Materialien

Die verwendeten Materialien (siehe auch Anhang A.1) wurden von folgenden Firmen bezogen:

- VWR International GmbH, Dresden
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- Karl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
- Clariant International Ltd., Muttenz (CH)
- MBI Fermentas, St.Leon-Rot
- Flucka Chemie AG, Buchs (CH)
- British BioCell International, Cardiff (UK)
- ABCR GmbH + Co KG Karlsruhe
- SERVA, New York (USA)

Unter Wasser wird in dieser Arbeit deionisiertes, filtriertes Wasser verstanden. Eine Liste der verwendeten Geräte ist in Tab.A.2 im Anhang zu finden.

## 3.2 Herstellung von Nanoholestrukturen in Chromschichten

### 3.2.1 Focused Ion Beam - fokussierter Ionenstrahl (FIB)

Um plasmonische Nanostrukturen mit EOT-Eigenschaften erzeugen zu können, die Durchmesser von 50 nm bis 150 nm und Lochabstände von 100 nm bis 300 nm aufweisen, ist eine hohe Präzision notwendig. Mit herkömmlichen Lithographiemethoden sind diese Kennwerte kaum zu erreichen, so dass zur Herstellung der Strukturen ein FIB eingesetzt wurde. Zusätzlich kann durch den feinen Ionenstrahl die Lochgeometrie verbessert werden. Durch das gezielte Abtragen von Material wird ein fast perfekter Zylinder in der Nanoholeform erreicht. Beispiele für Nanostrukturen, die mit FIB hergestellt wurden und welche die Bandbreite der Anwendungen demonstrieren sollen, sind in Abb. 3.1 abgebildet. In diesen Beispielen wurden mit Chrom beschichtete Glassubstrate verwendet. In Abb. 3.1 a) ist ein hergestelltes Smiley zu erkennen, bei dem mit einem starken Ionenstrahl sehr viel Material abgetragen wurde. Im Kontrast dazu ist in Abb. 3.1 b) eine sehr definierte Struktur abgebildet, die mit einem feinen Ionenstrahl erzeugt wurde. Größere Belichtungszeiten wie im Beispiel des Smileys führen dazu, dass zuerst das Chrom und später auch das Glas abgetragen wird. Im rechten Beispiel (Nanoholes) wurde dagegen mit wesentlich weniger Energie gearbeitet, wodurch sehr definierte Löcher nur innerhalb der Metallschicht entstehen.

Grundsätzlich ist FIB geeignet, um Strukturen mit vielen Freiheitsgraden und hoher Präzision herzustellen. Besonders die Herstellung von Nanoholearrays mit kleinen Perioden und kleinen Lochdurchmessern ist mit dieser Methode möglich. Ein weiterer Vorteil ist, dass nur ein einzelner Prozessschritt zur Erzeugung der gewünschten Struktur benötigt wird. Bei einer großen Anzahl an

Substraten ist jedoch die Elektronenstrahlolithographie besser geeignet. Allerdings führt bei dieser Technik die größere Anzahl an Prozessschritten zu Abweichungen von der Idealform eines Nanoholes. Eine Abwägung von Aufwand und Nutzen ist also in jedem Fall zu treffen.

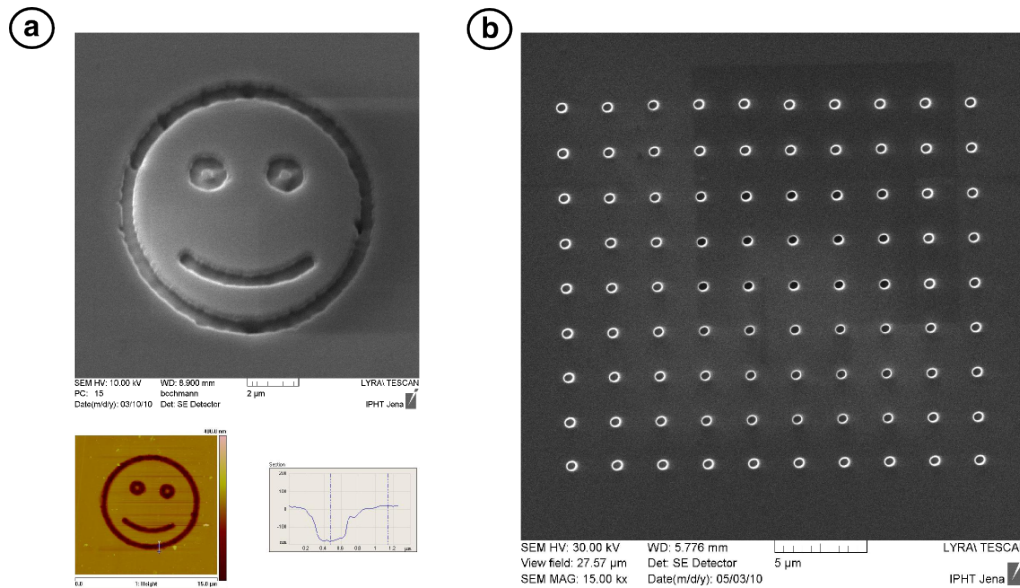


Abb. 3.1: Auswahl an mit FIB hergestellten Nanostrukturen

### 3.2.2 Elektronenstrahlolithographie - Electron Beam Lithography

Der große Vorteil der EBL gegenüber anderen Top-Down-Verfahren besteht in der extrem hohen Auflösung, die durch den Elektronenstrahl erreicht wird. Durch die hohen Beschleunigungsspannungen und die geringe Teilchengröße ist der Elektronenstrahl praktisch nicht beugungsbegrenzt, so dass sehr hohe Auflösungen erreicht werden können. Der in dieser Arbeit eingesetzte EBL-Schreiber erreicht eine Auflösung von 2 nm. Theoretisch ist auch eine höhere Auflösung möglich, jedoch wird die tatsächliche Auflösung durch zusätzliche Wechselwirkungen zwischen Elektronen und Fotolack bestimmt. Effekte, welche die Auflösung beeinflussen, sind die Streuung von Elektronen und das Entstehen von Sekundärelektronen, die zu einer Vergrößerung der Strukturen führen. Dennoch ist die EBL das Verfahren mit der höchsten Auflösung, das auch kommerziell am häufigsten eingesetzt wird. Ein weiteres Argument für die EBL ist die Möglichkeit, ganze Wafer in relativ kurzer Zeit zu belichten. Eine vollständige Belichtung eines Wafers benötigt zwar immer noch viele Stunden, aber im Vergleich zur FIB ist die Belichtungszeit wesentlich geringer (ca. 4 h für einen 13" -Wafer mit 64 Chips).

Abschließend lässt sich feststellen, dass die EBL für die Herstellung von Nanoholes das Optimum zwischen hoher Auflösung, belichteter Fläche und Geschwindigkeit darstellt und daher auch in dieser Arbeit zur Anwendung kommt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Nanoholestrukturen sind mittels Elektronenstrahlolithographie (EBL) hergestellt worden. Dabei kamen kommerzielle Maskenrohlinge für Photomasken (nanofilm, Westlake Village, CA, USA) zum Einsatz, die mit einem 80 nm dicken Chromfilm hoher optischer Dichte und Oberflächengüte versehen sind. Um die Nanoholes zu erzeugen, werden die Wafer mit einer 300 nm dicken Schicht des Standard-Elektronenstrahlresists *ZEP520A* (Nippon Zeon Co., Tokyo, Japan) bedeckt. Zusätzlich wird eine dünne Schicht Gold für die Belichtung aufgebracht. Die Belichtung erfolgt mit einem Elektronenstrahl von 20 keV an einer LION LV-1-Punktelektronenstrahlquelle

(VISTEC ELECTRON BEAM GMBH Jena, Germany) mit Vistec Optik. Nach der Belichtung wird die Goldschicht entfernt und das Resist mit *ZEP-RD standard* (Developer for ZEP520A, Nippon Zeon Co., Tokyo, Japan) für 40 s entwickelt. Danach werden die Wafer in einem Plasmaätzter (RIE, SENTEC, Berlin) mittels reaktiver Chlor- und Sauerstoffionen ( $Cl'$ ,  $O'$ ) geätzt. Nach dem Entfernen des restlichen Resists und dem Reinigen der Wafer wird zum Schutz der Substrate vor Umwelteinflüssen und mechanischen Beschädigungen, die zum Beispiel beim nachträglichen Sägen entstehen, ein Schutzlack (AZ1514H, MicroChemicals GmbH, Ulm, Germany) aufgebracht.

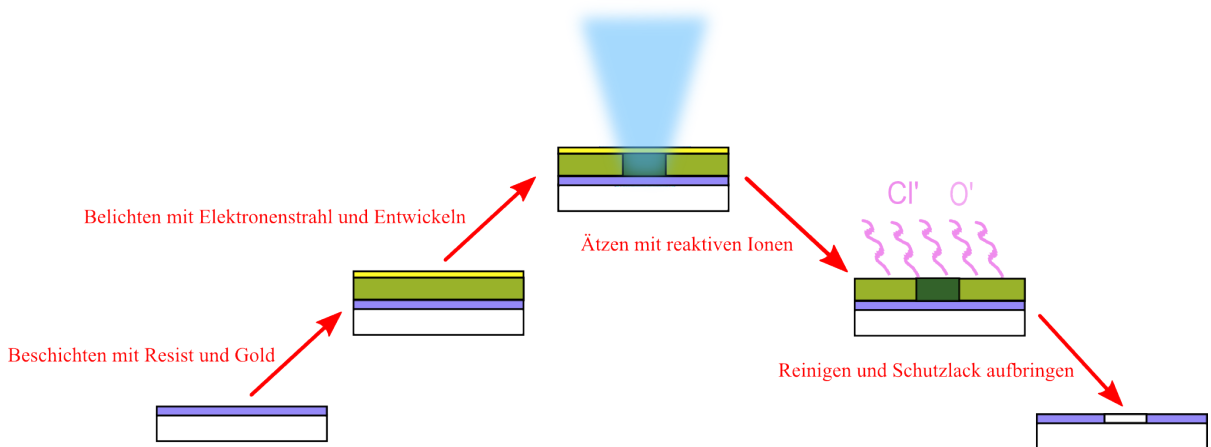


Abb. 3.2: Vereinfachtes Schema der Nanoholeherstellung mittels EBL

Um verschiedene Parameter der Nanoholestrukturen wie Tiefe, Form und Durchmesser einstellen zu können, werden der Sondenstrom, die Größe des Elektronenstrahls sowie die Ätzdauer gezielt verändert, wobei durch den Sondenstrom und die Ätzdauer hauptsächlich die Tiefe des Loches beeinflusst wird. Die Form der Strukturen wird hingegen maßgeblich durch den Elektronenstrahl bestimmt. Einen weiteren Einfluss auf die Form hat zudem der Ätzschritt. Als Ergebnis der Nanohole-Herstellung entstehen vier Quadranten mit jeweils vier Nanoholefeldern in einer  $20 \times 20$  Nanohole-Anordnung (Abb. 3.3).

### 3.2.3 Substratlayouts für die Hybridnanostrukturen

Die zur Herstellung der Hybridnanostrukturen gewählten Layouts werden an dieser Stelle kurz beschrieben. Es wurden zwei unterschiedliche Layouttypen, im Folgenden mit Typ I und Typ II bezeichnet, verwendet. Typ I ist ein Layout mit 9 separaten Nanoholefeldern, das heißt, es gibt 9 Zonen, in denen Nanoholes geätzt wurden. Diese Zonen sind mit einer Nummer, die sich direkt über dem Feld befindet, gekennzeichnet, um zum einen das Auffinden der Strukturen und zum anderen die Zuordnung zu erleichtern. In Abb. 3.3 ist das Layout von Typ I im Ganzen und als Detail dargestellt. Das Feld besteht dabei aus  $20 \times 20$  äquidistant angeordneten Nanoholes mit einem Abstand von  $2 \mu m$ . Dadurch hat das Feld eine Gesamtgröße von  $40 \mu m$  und kann auch bei einer 100-fachen Vergrößerung noch komplett im Mikroskop aufgenommen und abgebildet werden.

Bei den Substraten vom Typ II in Abb. 3.4 wurde die Anordnung der einzelnen Felder geändert, um den Einfluss von Streulicht infolge der Nummerierung auszuschließen. Dazu wurde ein Layout entworfen, das aus 16 Feldern besteht, die sich zu jeweils 4 Feldern um eine Zahl gruppieren. Der Abstand von Feld zu Zahl ist mit  $300 \mu m$  so gewählt, dass die Zahl weit außerhalb des abgebildeten Bereichs liegt.

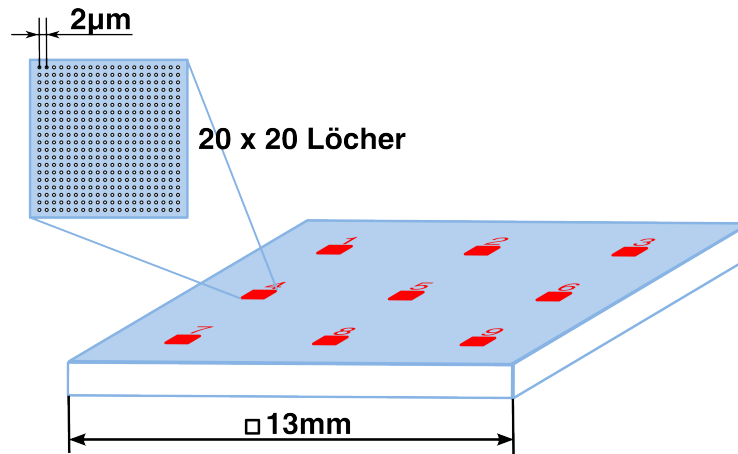


Abb. 3.3: Layout Nanoholesubstrat Typ I

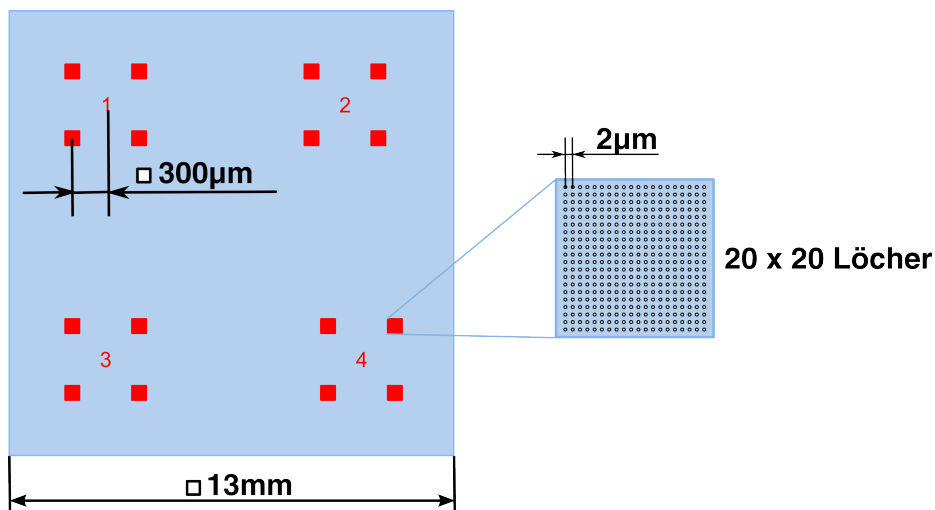


Abb. 3.4: Layout Nanoholesubstrat Typ II

Weiterhin können für eine 4er-Gruppe die Felder unterschiedlich hergestellt werden. Zusätzlich zum Standardlayout (siehe Abb. 3.4) wurden weitere Varianten getestet, wobei die Parameter Abstand und Anzahl der Löcher sowie die Lochtiefe geändert wurde. Von besonderer Bedeutung in dieser Arbeit ist die Variation der Lochtiefe, da sich mit diesem Parameter die optischen Eigenschaften der Nanoholes am stärksten beeinflussen lassen.

### 3.2.4 Herstellung von Silbernanoprismen

Die Silbernanoprismen werden nach einem Protokoll von D. Aherne<sup>[108]</sup> hergestellt. Dieses Protokoll ist ein zweistufiger Prozess, bei dem zuerst kleine sphärische Silbernanopartikel hergestellt werden, aus denen dann die Nanoprismen wachsen. Dabei wird die Größe der Prismen und damit auch die optischen Eigenschaften durch die Menge der Keimpartikel gesteuert. Nachfolgend sind in Tabellenform die einzelnen Schritte der Herstellung in der zeitlichen Reihenfolge dargestellt.

Keimpartikel			
Schritt	Stoff	Menge	Konzentration
1	tri-Natrium-Citrat	5 ml	2.5 mM
2	Poly(Natrium-Styrol-Sulfonat)	0,25 ml	500 $\frac{\text{mg}}{\text{L}}$ , 1000 kDa
3	Natrium-Borhydrid ( $\text{NaBH}_4$ )	0,3 ml	10 mM, frisch hergestellt
4	Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ )	5 ml	0,5 mM, zugemischt mit 2 $\frac{\text{ml}}{\text{min}}$
Nanoprismenherstellung			
1	destilliertes Wasser	5 ml	
2	Ascorbinsäure	0,75 $\mu\text{l}$	10 mM
3	Keimpartikel	20, 40, 60, 90,	120, 200, 260, 400, 500, 650 $\mu\text{l}$
4	Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ )	3 ml	0,5 mM, zugemischt mit 1 $\frac{\text{ml}}{\text{min}}$
5	tri-Natrium-Citrat	0,5 ml	25 mM

Tab. 3.1: Herstellungsprozedur von Silbernanoprismen

### 3.3 Prozessierung von Nanoholestrukturen zur Herstellung von Hybridnanostrukturen

Zur Herstellung kombinierter Nanostrukturen ist es notwendig, die hergestellten Nanostrukturen weiter zu prozessieren. Die Prozessschritte sind schematisch in der Übersicht in Abb. 3.5 dargestellt. Konzentrationsangaben sind in  $c = \text{mol/l}$  (M).



Abb. 3.5: Schema der Prozessierung von Nanohole-Substraten



### 3.3.1 Reinigung der Substrate

Im ersten Schritt der Prozessierung von kombinierten Nanostrukturen wird der Schutzlack entfernt und anschließend das Substrat gereinigt. Dieses wurde mit Hilfe eines kommerziellen Lackentferners auf organischer Basis<sup>1</sup> realisiert. Zum Entfernen der Lackschicht wurde das Substrat für 20 min in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen im Ultraschallbad mit dem Lackentferner behandelt. Nach Abspülen des Lackentferners mit destilliertem Wasser wurden verschiedene Waschschrte durchgeführt. Dazu wurden die Substrate zunächst mit Aceton für 1h im Ultraschallbad gereinigt. Danach wird Aceton gegen Rotisol ausgetauscht und die Substrate werden für weitere 30min behandelt. Als nächstes wurde Rotisol gegen Ethanol getauscht und die Substrate für 1h im Ultraschallbad gewaschen. Abschließend wurden die Substrate noch mit destilliertem Wasser abgespült und unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

### 3.3.2 Aktivierung der Substrate

Die Aktivierung der Substrate dient der Vorbereitung der Substratoberflächen für die nächsten Schritte, beispielsweise für die Anbindung einer selbstorganisierenden Monolage oder für eine direkte Veränderung der Oberflächeneigenschaften, wie zum Beispiel der Oberflächenspannung. Die Aktivierung erfolgte jeweils mit Hilfe einer chemischen oder mit einer physikalischen Methode (siehe Abb. 3.5).

#### Nasschemische Aktivierung

Zur chemischen Aktivierung wird eine basische Lösung verwendet. Diese ist notwendig, da eine saure Aktivierungslösung die Chromschicht mit den Nanostrukturen zerstören würde. Chrom hat aufgrund seiner Eigenschaften als unedles Metall keine chemische Beständigkeit gegenüber Säuren, weshalb alle Prozessschritte unter Verwendung von Säuren ausgeschlossen sind. Die hier verwendete Lösung besteht zu gleichen Teilen aus konzentriertem Ammoniak, konzentriertem Wasserstoffperoxid und destilliertem Wasser. Die Substrate wurden in der Aktivierungslösung für 30min bis 2h bei unterschiedlichen Temperaturen behandelt, da die Temperatur sowohl die Stärke der Aktivierung als auch deren Geschwindigkeit beeinflusst. So kann durch eine höhere Temperatur eine bessere Aktivierung erzielt werden. In dieser Arbeit wurde ein Temperaturbereich von 20 °C bis 70 °C untersucht. Die Temperierung erfolgte in einem Ofen (Konstantklimaschrank, Binder, Tuttlingen, Deutschland), dessen Temperatur regelbar ist.

#### Physikalische Aktivierung

Um die Oberfläche bei einem Substrat physikalisch zu aktivieren, kann ein Sauerstoffplasma verwendet werden. Dazu wurde ein Plasmaätzgerät der Firma TePla (München) genutzt, das über Mikrowellenstrahlung ein Plasma erzeugt. Hierbei lassen sich verschiedene Parameter wählen, die das Ergebnis der Aktivierung beeinflussen. Diese Parameter sind die Leistung der Mikrowellenstrahlung, der Druck des aktiven Gases und als wichtigster Parameter die Zeitdauer des Aktivierungsprozesses. Die Probe wird zunächst im Gerät mit einem Restdruck von 58 Pa unter Vakuum gesetzt. Danach wird das Prozessgas Sauerstoff mit einem Druck von 100 Pa eingespeist. Zuletzt werden die Substrate im Plasma in einem Leistungsbereich von 30 W bis 390 W aktiviert, was der maximalen Leistung des verwendeten Gerätes entspricht. Für die Dauer des Aktivierungsprozesses wurde ein zeitlicher Rahmen

---

<sup>1</sup>siehe Remover, Anhang A.1

von 5 min bis 30 min gewählt, da Versuche mit einer längeren Aktivierungsdauer zeigten, dass dies zu einer Zerstörung der Nanostrukturen führt.

### 3.3.3 Immobilisierung von Nanopartikeln

Wie in Abb. 3.5 schematisch dargestellt, kamen zur Immobilisierung der Nanopartikel verschiedene Strategien zum Einsatz, die teilweise aufeinander aufbauten. Bei der direkten Immobilisierung werden die Nanopartikel direkt nach der Aktivierung der Oberflächen aufgebracht. Die nächste Methode verändert die Oberflächeneigenschaften vor der Immobilisierung mit Hilfe einer selbstorganisierenden Monolage als guided-self-assembly - geführte Selbstimmobilisierung (GSA). Als letzte Strategie werden mit Hilfe selbstorganisierender Monolagen die Nanopartikel über eine DNA-Hybridisierung durch eine DNA geführte Immobilisierung - DNA directed immobilization (DDI) an die Oberfläche gebunden.<sup>[109]</sup>

#### Direkte Immobilisierung

Zur Integration von Nanopartikeln wurde die Methode des eintrocknenden Tropfens verwendet. Dazu wird eine Flüssigkeit, welche die zu immobilisierenden Nanopartikel enthält, über ein Substrat kontrolliert verdunstet. Die Immobilisierung der Nanopartikel wird über die bewegte Kontaktlinie<sup>2</sup> erreicht. Parameter wie Temperatur, Luftfeuchte und Oberflächenspannung beeinflussen die Immobilisierung dabei maßgeblich. Um die Temperatur und die Luftfeuchte zu regulieren, wurde ein Klimaschrank (Bender, USA) genutzt. Mit diesem Schrank lässt sich die Temperatur von 30°C bis 60°C einstellen und die relative Luftfeuchtigkeit in einem Bereich von 10% bis 40% regeln. Um zu verhindern, dass die Lösung mit den Nanopartikeln auf der Oberfläche des Nanoholechips eintrocknet, wurde ein Keil aus PDMS untergelegt (siehe Abb. 3.6). Gemeinsam mit dem Substrat bildet dieser Keil ein Reservoir, welches auch dann noch vorhanden ist, wenn die Kontaktlinie schon das komplette Substrat überstrichen hat. Die hierfür verwendeten Partikellösungen waren hauptsächlich kommerziell verfügbare Lösungen der Firma *British BioCell International (BBI)*. Diese Lösungen enthalten kolloidale Nanopartikel aus Gold und Silber in den Größen 30 nm, 60 nm, 80 nm und 100 nm in einer Konzentration von ca.  $10^8 \frac{\text{Particles}}{\text{ml}}$ . Weiterhin kamen auch selbsthergestellte Partikel unterschiedlicher Größe, Form und Material zum Einsatz wie zum Beispiel Goldnanostäbchen.

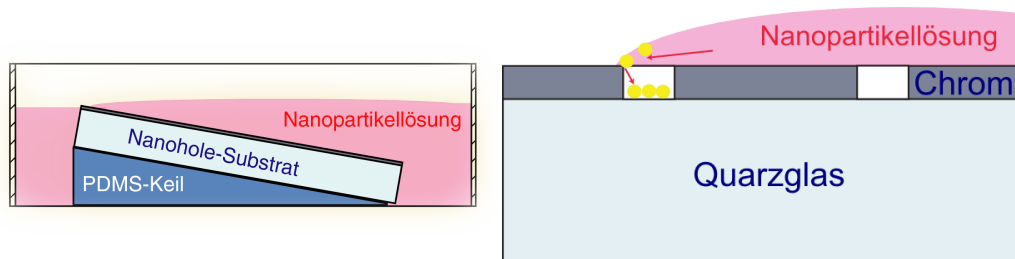


Abb. 3.6: Aufbau zur direkten Immobilisierung von Nanopartikeln

#### Immobilisierung unter Nutzung selbstorganisierender Monolagen, GSA

Die Immobilisierung von Nanopartikeln mittels selbstorganisierender Monolagen basiert auf der Modifizierung der Oberflächeneigenschaften des Substrats durch das Aufbringen organischer Moleküle auf die Oberfläche. In dieser Arbeit kamen verschiedene Moleküle zum Einsatz, welche die

<sup>2</sup>(siehe Abschnitt 2.3.4)

Oberflächeneigenschaften modifizieren. So wurde neben den Molekülen Mercaptohexanol (MCH) und Mercaptoundecansäure (MUA) auch 1-dodecyl-Phosphosphatsäure (doPhosAc) verwendet. Zur Immobilisierung dieser Moleküle wurden die Substrate in einer entsprechenden Lösung mit Konzentrationen von 1 mM bis 2 mM für mehrere Stunden bis zu einigen Tagen bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Um die Eignung der verschiedenen Monolagen zu testen, sind in unterschiedlichen Experimenten selbstorganisierende Monolagen hergestellt worden. Dabei wurden heterogene Monolagen aus einer Mischung von Mercaptohexanol und Mercaptoundecansäure sowie homogene Lagen, bestehend aus nur einer Verbindung, hergestellt. Als weiterer Parameter kamen für die Monolagen aus doPhosAc verschiedene Lösungsmittel wie Ethanol, destilliertes Wasser und Toluol zum Einsatz. Je nach verwendetem Molekül oder einer Mischung daraus wurden diese Parameter variiert. Unter Variation der Parameter wird im Folgenden ein verallgemeinerter Ablauf des Aufbringens selbstorganisierender Monolagen beschrieben. Direkt nach der Aktivierung wurden die Substrate in die Lösung für die entsprechende Monolage gegeben, wo sie unter ständiger Bewegung inkubiert wurden. Im Anschluss daran wurden alle Substrate mehrmals mit dem Lösungsmittel für die jeweiligen Moleküle gewaschen. Der letzte Waschschrift erfolgte mit Wasser und anschließender Trocknung mit Stickstoff. Abschließend erfolgte eine Immobilisierung der Nanopartikel wie unter dem Punkt direkte Immobilisierung (Kap. 3.3.3) beschrieben.

### **Immobilisierung mittels DNA-Hybridisierung von DNA-konjugierten Nanopartikeln, DDI**

Eine andere Strategie Nanopartikel zu immobilisieren, wurde durch die Ausnutzung einer DNA-Hybridisierung realisiert. Dazu muss im ersten Schritt eine Sequenz von DNA-Molekülen auf eine Oberfläche gebunden werden (Fängermoleküle). Im nächsten Schritt wurden Nanopartikel mit einer komplementären Sequenz konjugiert und dann an die Fängermoleküle hybridisiert. Um die Hybridisierung von DNA-Goldnanopartikeln durchzuführen, wurde zunächst eine Monolage doPhosAc nach der oben beschriebenen Prozedur aufgebracht. Danach wurde nach dem Protokoll von Kumar<sup>[110,111]</sup> eine Monolage aus (3-Glycidyoxypropyl)trimethoxysilan (GOPS) aufgebracht. Dazu wurde eine Lösung von 2 mM GOPS hergestellt und das Substrat anschließend für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Immobilisierung der GOPS-Schicht, die sich an die Glasflächen bindet, erfolgt die Immobilisierung der Fänger-Oligonukleotide. Diese werden im 2× SSC-Puffer mit einer Konzentration von 1 mM in einer Feuchtkammer über Nacht auf das Substrat gebracht. Um eine unerwünschte Hybridisierung von DNA-Nanopartikelnkonjugaten an der Chromoberfläche oder auf dem Glas zu vermeiden, werden Methoden zur Blockierung der freien Oberfläche, die frei von Fänger-Oligonukleotiden ist, genutzt. Dabei sind verschiedene Verfahren zum Einsatz gekommen, die im nächsten Abschnitt kurz beschrieben werden. Um dabei die bisher immobilisierten Fängermoleküle zu schützen, wurde zudem versucht, die Anbindung zu verstärken. Das kann durch Einbacken der DNA, die Anwendung von ultravioletten Licht oder einem Waschprotokoll geschehen.

#### **3.3.4 Blockierungsmethoden**

Die Blockierung dient dem Schutz der Oberfläche und soll eine unspezifische und unerwünschte Anbindung von DNA-Molekülen an der Oberfläche verhindern. Das ist notwendig, um die spezifisch gebundene DNA an den Fängermolekülen in den Löcher detektieren zu können.

**Einbacken der DNA** Dabei werden die Tropfen mit der Fänger-DNA für 1 h bei 80 °C eingetrocknet und gebacken. Dieser Schritt ermöglicht eine zusätzliche Stabilisierung der bindenden Moleküle, da sich dadurch alle Moleküle auf der Oberfläche befinden. Im nächsten Schritt wird zusätzlich die Oberfläche blockiert und die ungebundenen Moleküle entfernt.

**Ultraviolettes Licht, UV-Crosslinking** Die Substrate werden noch vor dem Waschen für 5 min mit einer starken ultravioletten Lichtquelle bestrahlt (50 W,  $\lambda = 291$  nm). Das hat eine Kreuzvernetzung der bindenden Aminogruppe an der DNA zur Folge.<sup>[112]</sup> Dadurch entstehen mehr kovalente Bindungen zwischen dem GOPS und der DNA und die DNA ist resistenter gegenüber der nachfolgenden Behandlung.

**Waschprotokoll** Das Waschprotokoll zur Entfernung ungebundener Fängermoleküle sieht folgende Schritte vor: Zunächst wird das Substrat mit 0,1 % Triton X-100 für 10 min und danach zweimal für je 2 min mit Salzsäure (*HCl*, 0,00005%, *pH* 4) gewaschen. Anschließend wird das Substrat 10 min mit 0,1 M Kaliumchlorid (KCl) gereinigt und für 1 min mit destilliertem Wasser gespült. Nun erfolgt der Schritt, der zum Blockieren der Oberfläche dient: das Waschen des Substrats mit 50 mM Ethanolamin mit 0,1% SDS (Natriumdodecylsulfat) in 0,1 M Tris-Puffer *pH* 9. Da dieser Schritt die Oberfläche für die Anbindung von freien DNA-Molekülen blockiert, kann nach dem einmütigen Waschen des Substrates mit destilliertem Wasser die Blockierung abgeschlossen werden. Zur Verbesserung des Ergebnisses können jedoch jederzeit weitere Blockierschritte angeschlossen werden.

Die Blockierung der Oberfläche kann durch die Verwendung von Lachssperma erreicht werden, das DNA-Fragmente enthält, welche die freien Stellen an der Oberfläche unspezifisch absättigen. Um die Oberfläche damit blockieren zu können, wurde ein Lösung aus

- 1,2 ml 100 mM Natriumphosphat
- 4 ml 6 × SSC-Puffer
- 1,2 ml 5 × Denhardts Reagenz
- 5,6 ml destilliertem Wasser
- 1 mg Lachssperma

hergestellt. Diese Lösung wurde dann bei 37°C für 1 h auf den Substraten inkubiert. Im Anschluss wurden die Substrate nochmals mit destilliertem Wasser gewaschen und unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

Zur Hydridisierung der Fängermoleküle auf den Substraten mit den DNA-konjugierten Goldnanopartikeln wurden die Substrate kopfüber in 15  $\mu$ l Lösung mit konjugierten Partikeln getaucht und für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 80 nm wurden nach dem Protokoll von Storhoff<sup>[113]</sup> mit DNA konjugiert. Dabei wurden folgende DNA-Sequenzen für die Substrate und Goldpartikel verwendet:

Ort	Kurzname	Sequenz
Substrat	A3N	5'-H <sub>2</sub> N - (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> - NH -CATTCCGCCCCGATAAAAGCA-3'
Goldpartikel	A3N	5'-(HS - CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CATTCCGCCCCGATAAAAGCA-3'
kompl. Sequenz	A3c	5'-TGCTTTTATCGGGCGGAATG-3'

Tab. 3.2: Verwendete DNA-Sequenzen

### 3.4 Rasterkraft- und Rasterelektronenmikroskope

Mit ultramikroskopischen Methoden lassen sich Nanostrukturen sichtbar machen. Mit diesen Ergebnissen lassen sich Anzahl und Anordnung von Nanopartikeln in Nanoholes analysieren und mit den optischen Daten abgleichen. Mit dem Rasterkraftmikroskop können sehr gut Höhen- und Oberflächeninformationen gemessen werden wie zum Beispiel Größe und Verteilung von Nanopartikeln auf Oberflächen. Das Rasterelektronenmikroskop bildet einen Materialkontrast ab und ermöglicht das schnelle Erstellen von Bildern mit hoher lateraler Auflösung. Beide Methoden sind komplementär einsetzbar und die Ergebnisse der Messungen der Hybridnanostruktur sind vergleichbar.

#### 3.4.1 Rasterkraftmikroskopie, AFM

Das Rasterkraftmikroskop ist ein hervorragendes Instrument zur Abbildung von Topographien im Nanometermaßstab. Dabei wird eine sehr feine Tastspitze in einem Raster über die Oberfläche geführt. Die Tastspitze (Cantilever) wirkt dort wie ein Biegebalken, der sich durch die Wechselwirkung mit der Oberfläche verformt. Diese Verformung ergibt ein Messsignal, das exponentiell zur Höhe der zu messenden Objekte auf der Oberfläche ist. Das in dieser Arbeit verwendete Rasterkraftmikroskop (*Nanoscope IIIa*) mit dem Kontroller Dimension 3100 (Veeco, New York, USA) stellt verschiedene Messkonfigurationen wie den Contact- und den Tapping-Mode für die Messung von Oberflächen zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde fast ausschließlich im Tapping-Mode, also im Modus mit einem intermittierenden Kontakt, gemessen. In diesem Modus wird der Cantilever mit einem Piezo nahe der Resonanzfrequenz angeregt und sehr nah (ca. 1 – 3 nm) an die Oberfläche gebracht. Als Messsignal und Regelgröße dient die Änderung der Schwingungsamplitude bei Interaktion mit einem Objekt, das heißt, der Regelkreis hält die Schwingungsamplitude konstant und ändert mit Hilfe des Piezos die Höhe. Dieser Modus hat mehrere Vorteile, die ihn zum bevorzugten Messmodus machen. Zum einen ist er durch die dynamische Messmethode relativ unempfindlich gegenüber Umgebungseinflüssen und niederfrequenten Schwankungen wie zum Beispiel Sprache, so dass er auch ohne Abschirmung genutzt werden kann. Zum anderen reduziert dieser Modus die Scherkräfte auf der Probe, was das Messen von weichen und damit insbesondere von biologischen Proben erleichtert. In Abb. 3.7 ist der Messkopf des verwendeten Rasterkraftmikroskops abgebildet. Es ist zu erkennen, dass die Durchbiegung des Cantilevers mittels Triangulation gemessen wird.

Die laterale Auflösung, die dieses Rasterkraftmikroskop liefert, hängt einerseits von der Anzahl der Pixel des Scanrasters ab und andererseits von den verwendeten Cantilevern und deren Spitzengeometrien. Die maximale Anzahl von Pixeln, die von der Kontrolleinheit pro Bild aufgenommen werden kann, beträgt 512 × 512 Pixel. Das heißt, dass die erreichte Auflösung mit der Größe der gemessenen Fläche skaliert. Aus praktischen Gründen wurden für detaillierte Aufnahmen von Nanohole-Substraten Bildausschnitte mit einer Fläche von 20 μm<sup>2</sup> gewählt, was einer Pixelgröße von 39 nm entspricht. Des Weiteren hängt die laterale Auflösung auch von der Geometrie

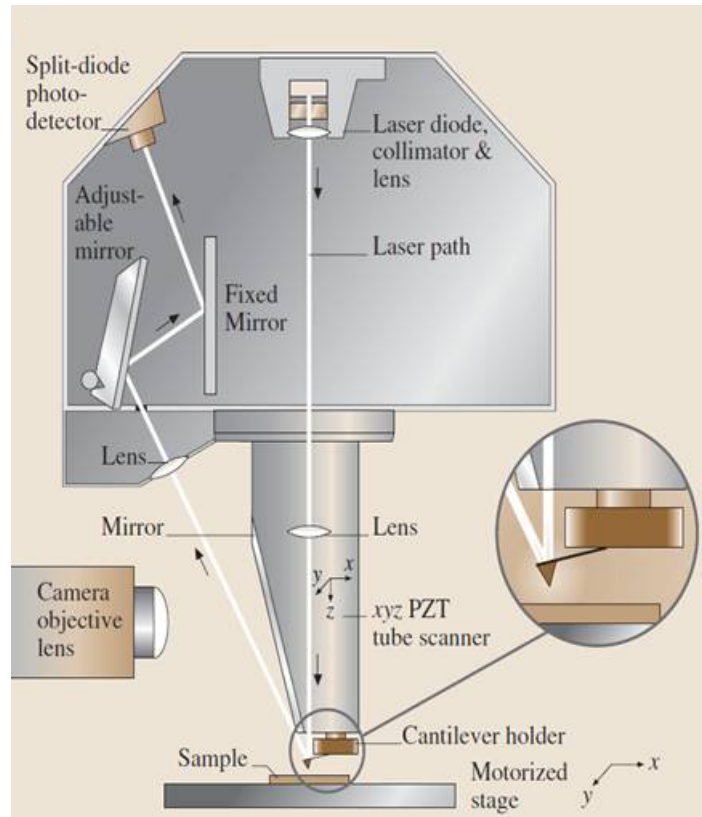


Abb. 3.7: Messkopf des Rasterkraftmikroskopes Nanoscope IIIa<sup>[114]</sup> 3

der Spitze ( $r_{\text{Spitze}} \leq 8 \text{ nm}$ ) ab. In dieser Arbeit wurden Spitzen aus Silizium von Nanoworld (BS Tap300, Neuchâtel, Schweiz) mit einer Federkonstante von ca.  $42 \text{ N/m}$  und einer Resonanzfrequenz zwischen  $250 \text{ kHz}$  und  $390 \text{ kHz}$  verwendet. Um eine Beeinflussung der Probe zu vermeiden, wurden Scangeschwindigkeiten zwischen  $0,250 \text{ Hz}$  und  $0,500 \text{ Hz}$  gewählt.

### 3.4.2 Rasterelektronenmikroskopie, REM

Das Rasterelektronenmikroskop nutzt zur Signalerzeugung einen gebündelten Elektronenstrahl und rastert damit eine Oberfläche Punkt für Punkt ab. Im einfachsten Fall werden für die Bildgebung die von dem Elektronenstrahl erzeugten Sekundärelektronen genutzt und erzeugen damit ein Bild der Oberfläche. Der Vorteil der Rasterelektronenmikroskopie besteht in der schnellen Bildgebung bei einer sehr hohen Auflösung (im Bereich von wenigen Nanometern). Ein Kontrast kann jedoch nicht für alle Materialien erreicht werden und einige Stoffe können durch den Elektronenstrahl zerstört werden. Die in dieser Arbeit gezeigten Rasterelektronenmikroskopaufnahmen entstanden alle an einem *JSM 6700F* von *JEOL* (Tokyo, Japan).

### 3.4.3 Transmissionselektronenmikroskopie, TEM

Das Transmissionselektronenmikroskop ist ein abbildendes Elektronenmikroskop, bei dem die Probe mit einem Elektronenstrahl durchstrahlt werden. Dabei wird die Probe im Gegensatz zum REM vollständig abgebildet und muss nicht gerastert werden. Die Elektronen werden dabei auf hohe Spannungen ( $80 - 400 \text{ kV}$ ) beschleunigt. Um trotz dieser hohen Spannungen die Probe durchdringen zu können, müssen die Proben entsprechend dünn sein. Für die Untersuchung von

Nanopartikeln wird üblicherweise ein dünner Polymerfilm auf Kupfergrids aufgebracht, auf dem dann die Partikel immobilisiert werden können. Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bietet für die Untersuchung von Nanopartikeln zwei Vorteile. Zum einen wird durch die hohen Beschleunigungsspannungen eine sehr hohe Auflösung (0,5 nm) erreicht, mit der sich die Dimensionen der Partikel bestimmen lassen. Des Weiteren entsteht bei der Abbildung ein Materialkontrast, durch den sich die Materialien der Nanopartikel unterscheiden lassen. Die hier gezeigten TEM-Aufnahmen wurden mit einem CEM 902A der Firma Carl Zeiss erzeugt.

### 3.5 Mikroskopie und Spektrometrie

Der Begriff der Mikroskopie umfasst eine Vielzahl physikalischer Prinzipien und entsprechender Gerätevarianten zur Vergrößerung kleiner Strukturen und Objekte. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit optischen Mikroskopen gearbeitet, wobei insbesondere das AxioImager Z1.m, ein aufrechtes Mikroskop der Firma Zeiss, Anwendung fand. Die wichtigsten Baugruppen dieses Mikroskops sind schematisch in Abb. 3.8 dargestellt. Bevor aber auf die Spezifika des verwendeten Mikroskops eingegangen wird, soll in diesem Abschnitt zunächst der allgemeine Aufbau optischer Mikroskope näher betrachtet werden.

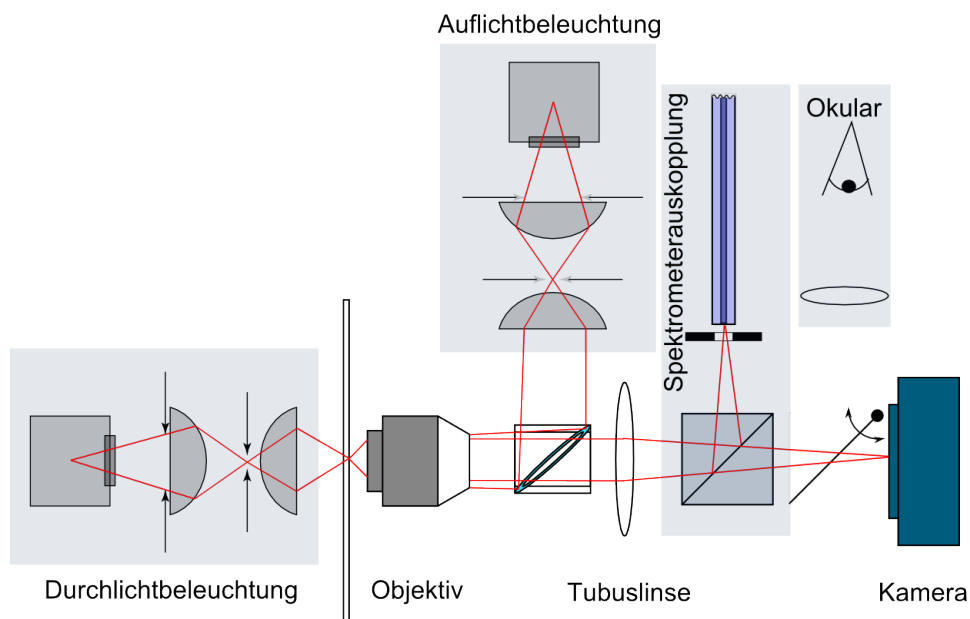


Abb. 3.8: Schematischer Aufbau des verwendeten Mikroskops AxioImager Z1.m

In einem Mikroskop lassen sich die optischen Elemente in zwei Strahlengänge unterteilen, die miteinander verflochten sind: den Beleuchtungsstrahlengang und den Abbildungsstrahlengang. Der Beleuchtungsstrahlengang besteht aus einer Lichtquelle und einer Kondensoroptik sowie einer Apertur- und einer Feldblende. Der Aufbau wird so realisiert, dass eine Köhlersche Beleuchtung<sup>[115]</sup> entsteht. Im Abbildungsstrahlengang befinden sich das Objektiv und die Tubuslinse, wobei in der Zwischenbildebene der Tubuslinse entweder das Okular oder die Kamera zu finden ist. Der Vorteil der Köhlerschen Beleuchtung besteht in der gleichmäßigen Ausleuchtung des Objekts bei gleichzeitiger Minimierung des Falschlichts, weshalb diese Art der Beleuchtung ohne wesentliche Veränderungen bis heute in allen optischen Mikroskopen zu finden ist. Durch die richtige Einstellung der Blenden ("köhlern") kann die Bildqualität gesteigert werden. Gerade für die Abbildung der hier verwendeten

Hybridnanostruktur ist eine gute Auflösung notwendig, da nur ein sehr geringer Teil des Lichtes zum Objektiv gelangt. Die verwendete Lichtquelle, eine Halogenlampe mit einer Leistung von 100 W und einer Farbtemperatur von 3200 K, wird zu einem großen Teil von der Chromschicht des Substrates geblockt. Aus diesem Grund wird durch das Einstellen der Strahlengangsblenden ein optimaler Kontrast erreicht. Auf der Abbildungsseite wird die Auflösung und die Bildqualität maßgeblich durch das Objektiv definiert. Die maximal mögliche Auflösung bei einem optischen Mikroskop kann dabei nach der von Ernst Abbe entwickelten Formel wie folgt berechnet werden:

$$d = \frac{\lambda}{2 n \sin(\alpha)} \quad (3.1)$$

Zum Auflösungsvermögen des Mikroskops tragen maßgeblich die Brechzahl  $n$  des Mediums und der halbe Öffnungswinkel  $\alpha$  des Objektivs bei, die zur Numerischen Apertur  $NA = n \sin \alpha$  zusammengefasst werden. Da der Öffnungswinkel nicht größer als  $90^\circ$  werden kann, liegt das Limit für optische Mikroskope im sichtbaren Bereich bei ungefähr 300 nm. Das verwendete Objektiv besitzt neben einer  $100\times$  Vergrößerung eine numerische Apertur von  $NA = 0.9$  und erreicht damit bei 500 nm fast die Auflösung von 300 nm. Kleine Objekte wie Nanostrukturen können nur dann sichtbar werden, wenn sie spezielle optische Eigenschaften besitzen. Eine weitere Konsequenz ist, dass z.B. bei durch die Streuung sichtbar gemachten Nanostrukturen immer der Lichtkegel abgebildet wird und nicht das Objekt selbst. Dies folgt aus der beugungsbegrenzten Abbildung kleiner Objekte, die durch die Abbildung ihre spektralen Informationen überlagern und sich dadurch als ein gemeinsames Objekt zeigen. Nahe beieinander liegende Nanostrukturen lassen sich demnach nicht trennen. Obwohl alle optischen Mikroskope dieselben Eigenschaften besitzen, weist das in dieser Arbeit verwendete Zeiss-Mikroskop einige Besonderheiten auf. Für die reele Abbildung der vergrößerten Objekte auf die Kamera besitzt das Mikroskop eine Tubuslinse mit einfacher Vergrößerung. Die verwendete Farbkamera von Zeiss (Axio Cam MRc 5) besitzt bei einer Pixelanzahl von 5 MPx eine Pixelgröße von  $3,4 \mu\text{m}$  mit einer Digitalisierungstiefe von 12 bit pro Farbkanal und ermöglicht somit eine sehr hohe Qualität der Bilder.

Zunächst ist das Mikroskop sowohl für die Fluoreszenzmikroskopie als auch für materialmikroskopische Untersuchungen ausgerüstet. Es besitzt des Weiteren eine Auflicht- sowie eine Durchlichtkonfiguration. In Auflichtbeleuchtung können sowohl Fluoreszenzfilter als auch Auflichtdunkelfeldkondensoren verwendet werden. Diese Kondensoren ermöglichen die Visualisierung von Edelmetallnanopartikeln über deren Streulicht. Prinzipiell funktioniert ein Dunkelfeldkondensor, indem ein Ring in die Objektebene abgebildet wird, der alles Licht von der Mitte blockt. In der Durchlichtkonfiguration kann ein Dunkelfeld über einen mit Immersionsöl betriebenen Dunkelfeldkondensor genutzt werden. Dieser liefert im Allgemeinen bessere Ergebnisse, da er aufgrund seiner hohen Apertur mehr Streulicht aus der Mitte blockt. Diese Konfiguration wird genutzt um das Streulicht einzelner Nanopartikel auf einer Oberfläche sichtbar zu machen. Für die in dieser Arbeit untersuchten Nanoholes wird das Mikroskop im Durchlicht-Hellfeld-Modus eingesetzt und bildet dabei die Transmission einzelner Nanoholes ab. Eine weitere Besonderheit dieses Mikroskops ist ein Teilerspiegel mit einer 50 : 50 -Teilung, der sich hinter der Tubuslinse befindet. Dieser kann bei Bedarf eingeschwenkt werden und ermöglicht die Einkopplung von Licht in das Spektrometer. Diese Einkopplung wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit entworfen und optimiert und ermöglicht die spektrale Messung einzelner Nanostrukturen. Realisiert wird dies durch eine kleine Blende, die genau in der Zwischenbildebene des Mikroskops steht und hinter der sich unmittelbar ein Multimode-Lichtwellenleiter mit einem Kerndurchmesser von  $400 \mu\text{m}$  befindet. Die Größe des Kerns und der Akzeptanzwinkel der Faser garantieren, dass der gesamte Lichtstrahl, der die Blende passiert, von der Faser gesammelt wird und zum Spektrometer gelangt.



Zur spektralen Charakterisierung wurde in dieser Arbeit ein Gitterspektrometer (SpectraPro 2300i) der Firma Princeton Instruments (MA, USA) genutzt. Dieses besitzt zwei Dispersionsreflektionsgitter mit  $150 \frac{\text{lines}}{\text{mm}}$  beziehungsweise  $600 \frac{\text{lines}}{\text{mm}}$ . Die Dispersionsgitter sind das entscheidende Bauteil bei diesem Spektrometertyp. Sie bestimmen einerseits die zu erreichende Auflösung und andererseits die Wellenlängen, die von der Kamera aufgezeichnet werden. Das verwendete Gitter mit einem Sägezahnprofil (Blaze) spaltet das Licht, das am Eintrittsspalt ankommt, in seine spektralen Bestandteile auf und führt es auf die Kamera. Das Gitter arbeitet dabei nach dem Prinzip konstruktiver und destruktiver Interferenz an den Graben des Gitters. Im Falle des Dispersionsgitters führt der Gangunterschied des einfallenden parallelen Strahlenbündels und des reflektierten Strahlenbündels zur Interferenz. Konstruktive Interferenz entsteht dabei für eine Wellenlänge unter der Bedingung  $\Delta s = d * (\sin(\alpha) + \sin(\beta)) = m\lambda$ . Dieser Effekt führt über die Gesamtheit aller vorhandenen Graben dazu, dass der Winkelbereich, in dem eine Reflexion auftritt, sehr begrenzt ist und dass die Winkeldispersion abhängig von der Anzahl der Graben in der beleuchteten Fläche ist. Es gilt  $\frac{\lambda}{\Delta\lambda} = mN$ . Das Gitter mit der höheren Grabendichte zeigt demnach eine höhere Dispersion und die damit erreichbare Auflösung der Wellenlänge wird größer. Der Winkel des Gitters ist dabei so gestaltet, dass für eine bestimmte Wellenlänge alles einfallende Licht in die 1. oder 2. Ordnung gebeugt wird. Die Bedingung für den Blazewinkel ist, dass durch den Grabenwinkel des Gitters die gewünschte Interferenzordnung  $m = 1$  mit dem Reflexionswinkel der geometrischen Optik zusammenfällt und somit alles Licht in diese Beugungsordnung fällt. Das entstehende Beugungsmuster wird dann über Hohlspiegel in die Kamera abgebildet. Dabei stellen die Pixel die Wellenlänge dar und die Intensität der einzelnen Wellenlängen wird durch die gesammelten Ladungen an der CCD-Kamera sichtbar. Da der verwendete CCD-Chip eine vorgegebene Anzahl von Pixeln mit einer bestimmten Breite hat, wird dadurch der im Spektrometer angezeigte Bereich von der Wellenlänge sowie durch deren Auflösung bestimmt. Im speziellen Fall des PI SP-2300i wird für das  $150 \frac{\text{lines}}{\text{mm}}$  Gitter eine Auflösung von  $\Delta\lambda = 1,101 \text{ nm}$  und für das  $600 \frac{\text{lines}}{\text{mm}}$  Gitter von  $\Delta\lambda = 0,262 \text{ nm}^4$  erreicht.

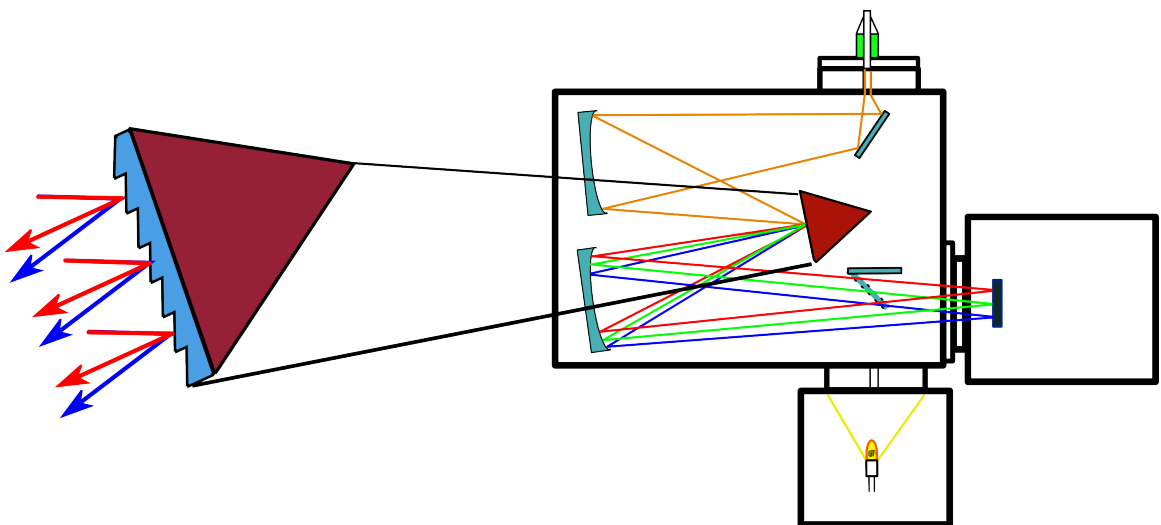


Abb. 3.9: Schematischer Aufbau des Spektrographen mit geblaztem Gitter

<sup>4</sup><http://www.princetoninstruments.com/spectroscopy/calculator/>

### 3.6 Automatisierte Auswertung von Biosensoren

Für die Auswertung von Daten der Hydrinanostrukturen müssen zwei grundsätzliche Bereiche unterschieden werden. Das sind zum einen die spektralen Daten, die eine Vorverarbeitung benötigen. Der andere Teil der Daten sind Bilddaten, aus denen Merkmale extrahiert werden können. In diesen beiden Bereichen werden verschiedene Algorithmen genutzt, von denen die wichtigsten bereits im Kapitel 2.4 vorgestellt wurden. In diesem Abschnitt sollen kurz die Abläufe zur Extraktion von Merkmalen sowie deren statistische Auswertung vorgestellt werden. Prinzipiell wurden zwei Softwarepakete eingesetzt, das Programm *MatLab* von Mathworks (Natick, MA, USA) und das GNU R Softwarepaket zur statistischen Auswertung von Daten. Beide Programme bieten ähnliche Funktionalitäten, die kombiniert genutzt werden können.

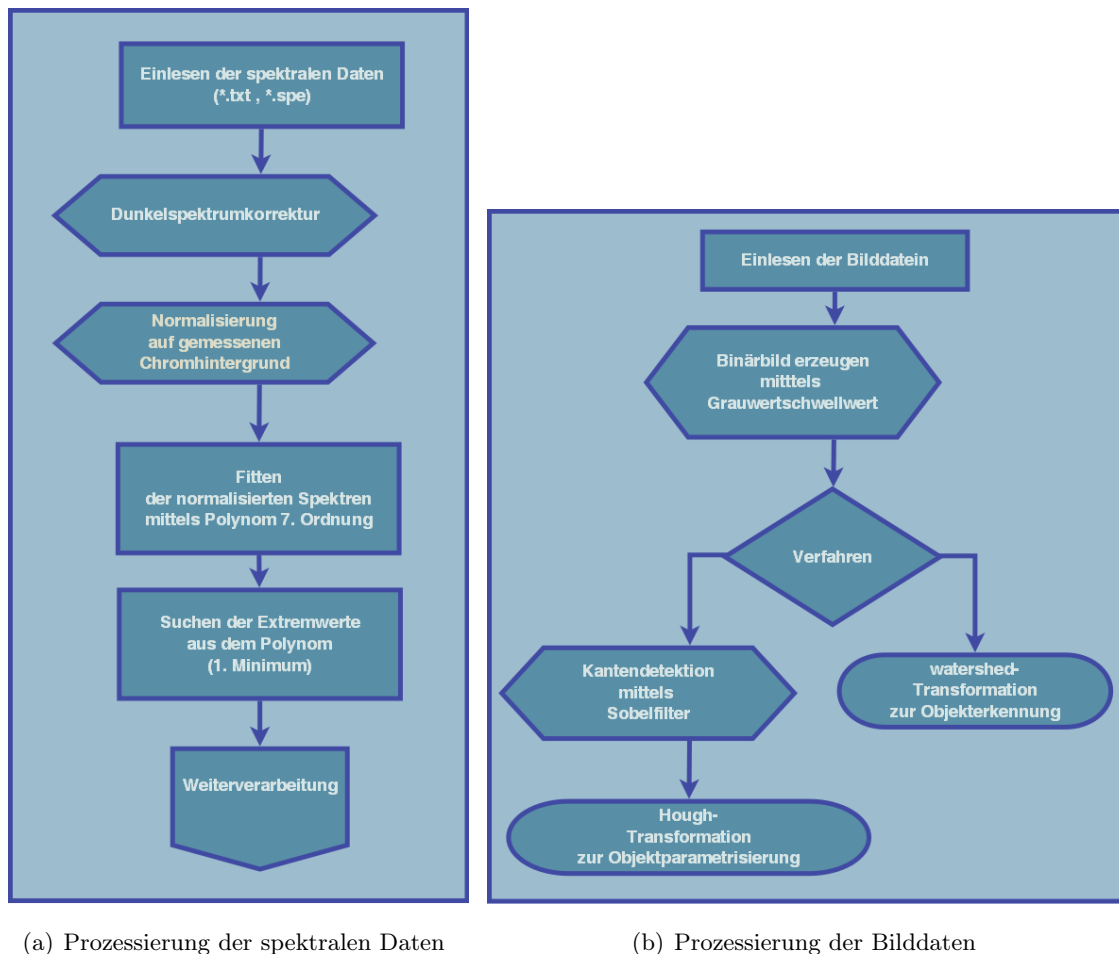


Abb. 3.10: Schema zur Prozessierung der Daten

#### 3.6.1 Extraktion von Merkmalen aus spektralen Daten

Um die Merkmale aus spektralen Daten extrahieren zu können, werden die Spektren mit dem Softwarepaket R bearbeitet. Prinzipiell ist diese Auswertung auch in *MatLab* möglich, jedoch bietet das in R geschriebene Skript den Vorteil, dass es auch das native Datenformat des Spektrometers lesen und verarbeiten kann (Abb. 3.10). Zunächst wird von allen Spektren ein Dunkelspektrum abgezogen. Dieses

ohne Lichtquelle aufgenommene Spektrum misst den Dunkeloffset und damit auch das Grundrauschen. Als nächstes werden die Spektren der Nanoholes auf die der gemessenen Chromtransmission normiert.

$$I_{\text{normiert}} = \frac{I_{\text{Nanohole}} - I_{\text{dunkel}}}{I_{\text{Chromhintergrund}} - I_{\text{dunkel}}} \quad (3.2)$$

Da diese Spektren in derselben Konfiguration gemessen werden, beinhalten sie neben dem Hintergrund der Chromschicht auch sämtliche Einflüsse von Lichtquelle, Objektiv und Mikroskop. Dadurch entstehen Spektren, die das Verhältnis zwischen der Transmission einer Chromschicht und der Transmission durch ein Nanohole wiedergeben. Alle Werte größer als eins stehen dabei für Wellenlängen mit erhöhter Transmission. Danach werden alle Spektren mit Hilfe eines Polynoms gefittet. Das Fitten ermöglicht es, die Spektren als Funktion darstellen zu können, um dann lokale Minima suchen zu können. Nach dem Polynomfit werden die Extremwerte durch Bilden der 1. Ableitung bestimmt und das erste Minimum als Merkmal extrahiert. Dieses Merkmal kann schließlich für statistische Auswertungen herangezogen werden.

### 3.6.2 Extraktion von Merkmalen aus Bilddateien

Aus den erhaltenen Bilddateien können Merkmale extrahiert werden, die der Klassifikation verschiedener Nanoholes dienen. Wichtige Eigenschaften und Parameter sind dabei die Helligkeit, die Farbwerte und die Größe des Nanoholes auf dem Bild. Die Bildauswertung erfolgte mit dem Softwarepaket *MatLab*. Als erster Schritt nach dem Einlesen der Bilddateien erfolgte das Ermitteln eines Schwellwertes für die Binarisierung des Bildes. Dieser Wert wird über die Verteilung der Grauwerte des Bildes bestimmt. Die Grauwerte entsprechen den Helligkeiten im Bild und werden über die Werte der Rot-, Grün- und Blaukanäle berechnet. Nach der Binarisierung können verschiedene Verfahren genutzt werden, um Merkmale zu extrahieren. Eine Variante ist es, erst eine Kantendetektion über einem Sobel-Filter durchzuführen und anschließend mittels Hough-Transformation die Objekte zu parametrisieren und damit zu erkennen. Eine andere Möglichkeit einzelne Objekte aufzuzählen, ist die Durchführung einer Watershed-Transformation<sup>5</sup> am Binärbild. Danach erfolgt mit den einzelnen Objekten eine statistische Auswertung und Klassifikation. Als Klassifikationsmethoden eignen sich der k-means-Algorithmus oder die lineare Diskriminanzanalyse (LDA).

Die Ergebnisse der extrahierten Merkmale lassen sich mit Hilfe verschiedener Plots darstellen. Eine geeignete Möglichkeit, Merkmale aus spektralen Daten und Bilddaten darzustellen, ist der Boxplot<sup>[116]</sup> (siehe Abb. 3.11(a)), in dem alle relevanten statistischen Größen enthalten sind. Eine andere Variante für Bilddaten ist das YRGB-Diagramm. Die Werte für dieses Diagramm berechnen sich nach folgenden Formeln:

$$x_{YRGB} = \frac{(R_{NH} + G_{NH}) - (Y_{NH} + B_{NH})}{(R_{NH} + G_{NH} + B_{NH} + Y_{NH})} \quad (3.3)$$

$$y_{YRGB} = \frac{(Y_{NH} + R_{NH}) - (G_{NH} + B_{NH})}{(R_{NH} + G_{NH} + B_{NH} + Y_{NH})} \quad (3.4)$$

Dabei stehen die Größen Y, R, B, G für die Helligkeit (Y), den Rotkanal (R), den Blaukanal (B) und den Grünkanal (G). Anhand dieses Diagrammtyps lassen sich sehr gut Veränderungen an den Nanoholes darstellen (siehe Abb.3.11(b)).

---

<sup>5</sup>siehe auch Kap. 2.4

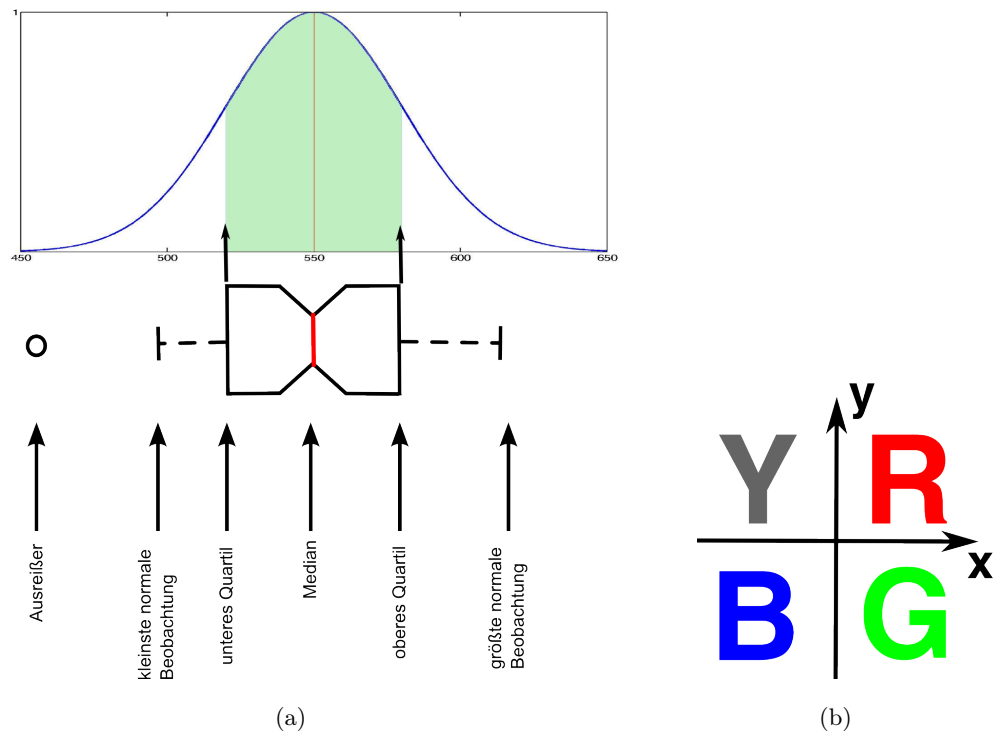


Abb. 3.11: Boxplot (a) und 4-Quadrantendarstellung (b)

### 3.6.3 Prozessierung von Imaging-Spektrometerdaten

Die Daten, die das Imaging-Spektrometer liefert, bestehen aus einzelnen Bildern, die über die Änderung der optischen Wegstrecke aufgenommen werden. Diese Bilder werden mit Hilfe der oben beschriebenen Methoden vorverarbeitet und die Daten der erkannten Objekte zu einem Interferogramm zusammengefügt. Dazu wurde ein MatLab-Skript entwickelt, das eine Objekterkennung durchführt, die Inferogramme der Objekte ermittelt und anschließend eine Fourier-Transformation durchführt, welche die Spektren der einzelnen Nanoobjekte liefert. Im ersten Schritt entsteht dabei für jedes Objekt im Bild ein Interferogramm, das im nächsten Schritt zu einem Spektrum umgerechnet wird. Dazu wird zuerst das Interferogramm mit Nullen gefüllt, um eine Nullsymmetrie zu erzeugen. Danach wird eine Gerade an das Interferogramm gefittet und vom Interferogramm abgezogen. Dieser Schritt dient der Beseitigung des Gleichanteils im Interferogramm, der sich bei einer Fourier-Transformation als zusätzlicher Signalanteil bemerkbar machen würde.

Der nächste Schritt der Datenverarbeitung der Interferogramme ist die Anwendung einer Fensterfunktion. Diese Fensterfunktion dient der Unterdrückung der Nebenmaxima, die aufgrund der endlichen Weglänge im Spektrum auftreten würden. Um diese Nebenmaxima zu unterdrücken, wurden verschiedene Fensterfunktionen wie Gauss-Fenster, Blackman-Harris-Fenster und Hanning-Fenster angewendet (siehe Abb. 3.12). Die hier gezeigten Fensterfunktionen wurden zu Testzwecken in die programmierten MatLab-Skripte eingebunden, um dann die optimale Fensterfunktion auswählen zu können.

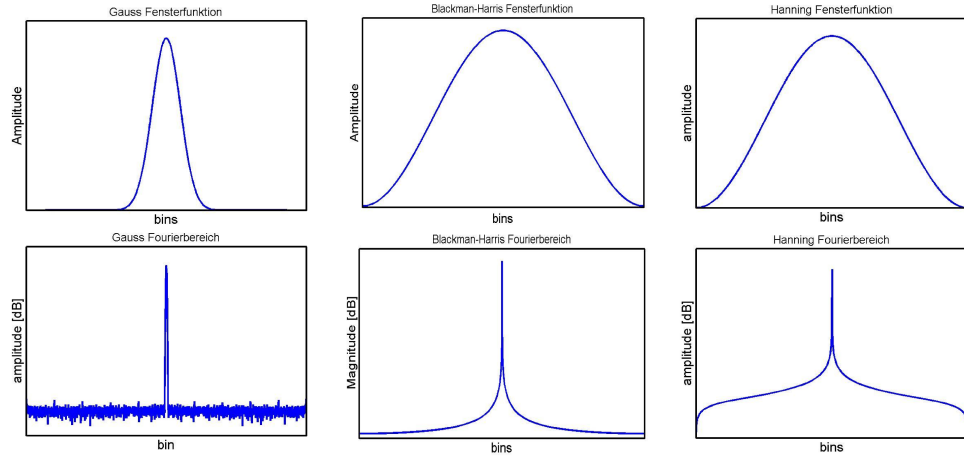


Abb. 3.12: Genutzte Fensterfunktionen für die Apodisierung

$$w(n) = 0.424 - 0.497 \cos\left(\frac{\pi n}{M}\right) + 0.079 \cos\left(\frac{2\pi n}{M}\right) \quad \text{Blackman-Harris Fenster} \quad (3.5)$$

$$w(n) = \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{(n - (M-1)/2)^2}{\sigma(M-1)/2}\right] \quad \text{Gauss Fenster} \quad (3.6)$$

$$w(n) = \frac{1}{2} \left(1 + \cos\left(\frac{2\pi n}{M}\right)\right) \quad \text{Hanning Fenster} \quad (3.7)$$

Die Gleichungen zur Berechnung der Filterfunktion sind in den Gleichungen 3.5-3.7 angegeben. Die Anwendung der verschiedenen Funktionen wird durch den jeweiligen Datensatz bestimmt. Durch die endliche Länge des Datensatzes entsteht bei der FourierTransformation immer ein Rechteckfenster um den Datensatz herum. Mit Hilfe der oben genannten Funktionen werden die Signale am Rand weniger gewichtet und so Artefakte unterdrückt.

Nach der Apodization wird als nächster Schritt eine *Fast-Fourier-Transformation* durchgeführt und das Interferogramm in ein Spektrum umgerechnet. Für die Berechnung der Wellenlängenachse wird eine Referenzmessung mit einem grünen Nd:YAG-Laser (532 nm) oder Messungen mit Interferenzfiltern herangezogen.

### 3.7 Simulationen

Zur Simulation und Berechnung der Eigenschaften von Nanoholes und Nanopartikeln gibt es unterschiedliche numerische und analytische Ansätze. Zur numerischen Berechnung von Transmissionseigenschaften wird die Finite Elemente Methode (FEM) und die Generalized Multiple Multipol Method (GMMM) verwendet.

Bei FEM wird das zu berechnende Gebiet in einzelne Teilgebiete zerlegt. In diesen finiten Elementen können dann über die Definition einer Ansatzfunktion sowie der Randbedingungen die partiellen Differentiellen gelöst werden, die das Problem beschreiben. Da FEM auf der Berechnung einzelner Elemente basiert, wird auch die Genauigkeit der Berechnung mit der Anzahl der Elemente größer. Nachteilig ergibt sich daraus auch, dass solche Programme für komplexe Probleme viel Rechenkapazität und Speicherplatz benötigen, was vor allem der Fall ist, wenn 3D-Objekte berechnet werden sollen.

In dieser Arbeit wurde das Programm *COMSOL* (FEMLab, Burlington, MA, USA) zur Berechnung optischer Eigenschaften von Nanopartikeln genutzt. Im Programmpaket von *COMSOL* sind bereits verschiedene Modelle mit ihrer physikalischen Beschreibung hinterlegt, so dass auf diese bei der Simulation zurückgegriffen werden kann. Um die Extinktion von Nanopartikeln darstellen zu können, wurde ein Modell zur Ausbreitung von gestreuten elektromagnetischen Wellen verwendet. Dieses Modell wurde für einen Wellenlängenbereich von 350 nm bis 750 nm berechnet. Außerdem wurden Simulationen zum elektrischen Feld von mikrostrukturierten Chips durchgeführt, die zum dielektrophoretischen Einfangen von Mikro- und Nanoobjekten genutzt werden. Diese wurden sowohl für den 2D- als auch für den 3D-Fall mittels eines quasistatischen Modells für das elektrische Feld berechnet.

Eine andere Methode der numerischen Berechnung ist die generalisierte Multiple-Multipol-Technik.<sup>[117,118]</sup> Diese Methode basiert darauf, dass das unbekannte Feld durch eine Superposition von Funktionen mit unbekannten Koeffizienten, welche die Lösungen der Maxwell-Gleichungen in dem zu betrachtenden Gebiet sind, approximiert wird. Die Koeffizienten werden durch Lösen der Gleichungen mit den Randbedingungen an wohldefinierten Punkten gefunden. Darüber lässt sich dann das gesamte Problem sowie die Eigenschaften eines einzelnen Nanoholes mit Nanopartikeln berechnen. Der Vorteil der Multiple-Multipol-Technik liegt darin, dass wesentlich weniger Speicher- und Rechenkapazität benötigt wird, da die partiellen Differentialgleichungen nicht für alle Punkte gelöst werden müssen. Des Weiteren ist von Vorteil, dass diese Methode in einem Open-Source-Paket (*OpenMax*) implementiert ist.

## 4 Ergebnisse und Diskussion der Charakterisierung der Hybridnanostruktur für die Anwendung in der Bioanalytik

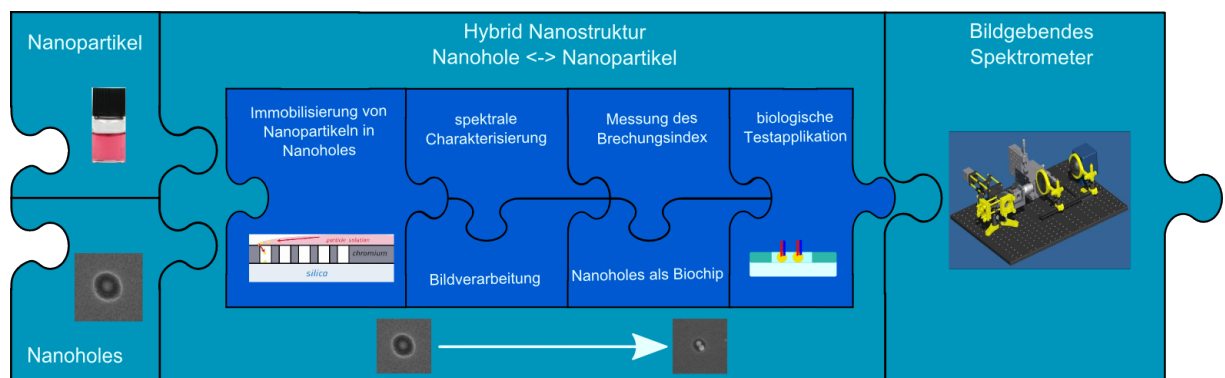


Abb. 4.1: Schema Ergebnisteil

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse dieser Arbeit ausgehend von der Untersuchung einzelner Nanostrukturen über die Herstellung der Hybridnanostruktur und Charakterisierung mittels ultramikroskopischer Techniken bis hin zur biologischen Testapplikation beschrieben. Ziel ist es, neben der Optimierung des Herstellungsprozesses diese Hybridnanostruktur als Sensorplattform für die Bioanalytik zu untersuchen. Das Finden möglicher Messgrößen, die eine hohe Sensitivität bei gleichzeitig hohem Durchsatz erlauben, spielt dabei eine wesentliche Rolle. Die Verzahnung der verschiedenen Bereiche ist in Abb. 4.1 verdeutlicht. Auf Basis dieser Abbildung wird im nächsten Abschnitt mit der Betrachtung der Nanopartikel als eine der beiden Grundelemente der Hybridnanostruktur begonnen. Diese Grundelemente, Edelmetallnanopartikel und Chrom-Nanoholes, bilden mit ihren optischen Eigenschaften das Fundament für einen optisch auszulesenden Biosensor. Die einzelnen Elemente wurden dabei schon vor der Assemblierung der Hybridnanostruktur charakterisiert, um die optischen Eigenschaften zu erkennen und Parameter für die Beeinflussung der optischen Eigenschaften zu finden. Insbesondere die Parameter Größe, Form und Material haben einen erheblichen Einfluss auf die Edelmetallnanopartikel. Die hier geführten Untersuchungen zeigen, welche Nanopartikel prinzipiell in der Hybridnanostruktur eingesetzt werden können und wie diese durch die optischen Eigenschaften beeinflusst werden. Bei den Chrom-Nanoholes stehen die grundlegenden optischen Eigenschaften im Vordergrund sowie deren Einfluss auf die Herstellungsparameter. Dabei wird auf spektrale Messungen und gemessene Bilddaten zurückgegriffen. Anhand dieser Daten lassen sich Parameter wie Qualität und Tiefe der Nanoholes beurteilen.

Der Herstellungsprozess der Hybridnanostruktur wird durch die Ergebnisse der verschiedenen Herstellungsstrategien dargestellt. Dabei wird veranschaulicht, welche Verfahren den größten Erfolg bei der Selbstassemblierung versprechen und welche Schritte notwendig sind, um ein optimales Ergebnis bei der Herstellung der Hybridnanostruktur zu erreichen.

Die optische Charakterisierung erfolgte, wie bei den Nanoholes, mittels mikrospektroskopischer Messungen und der Auswertung von Bilddaten. Anhand der spektroskopischen Messwerte wurden die Einflüsse der unterschiedlichen Nanopartikelparameter und die Nanopartikelanzahl betrachtet und ausgewertet. Die Bilddaten liefern ergänzende Datenwerte, mit denen eine parallele Auswertung einer großen Anzahl von Nanostrukturen möglich wird.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde mit Hilfe unterschiedlicher Testmoleküle die Tauglichkeit der Hybridnanostruktur als Sensor für die Bioanalytik analysiert. Abschließend wurden diese Untersuchungen mit der Anwendung in einem biologischen Testsystem (DNA-Sensorik) abgeschlossen. Ergänzend dazu wurde die Möglichkeit der Anwendung der Nanopartikel als Marker in den Nanoholes für eine DNA-Hybridisierung untersucht.

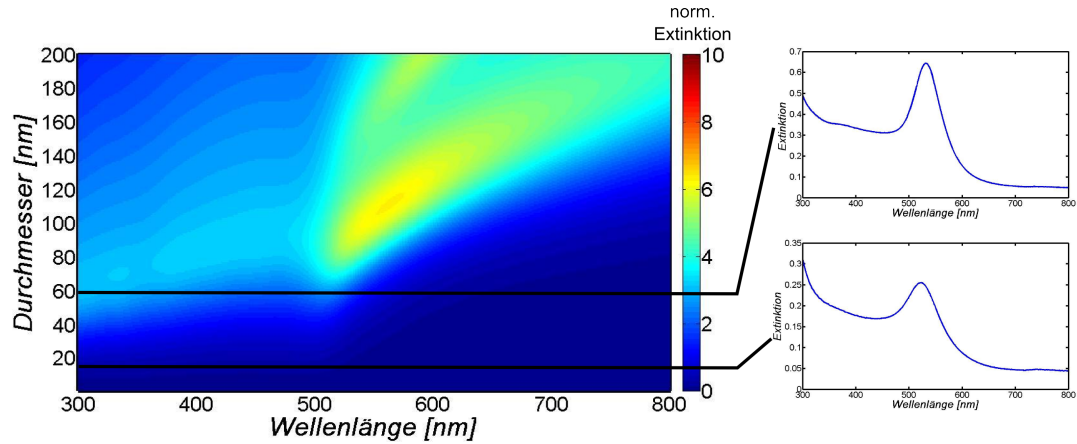
Die Versuchsergebnisse gingen auch in die Entwicklung eines hyperspektralen bildgebenden Spektrometers ein, das im Rahmen dieser Arbeit aufgebaut und in Betrieb genommen wurde. Anhand der ersten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass mit diesem Spektrometer Nanostrukturen parallel spektral gemessen und ausgewertet werden können.

## 4.1 Herstellung und Charakterisierung von Nanopartikeln

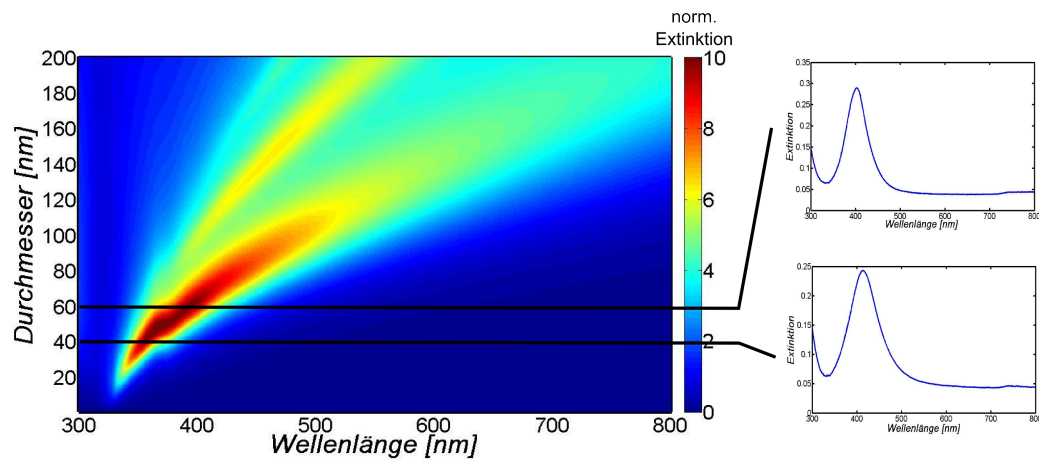
Die plasmonischen Eigenschaften nanoskaliger Partikel werden, wie schon in Kapitel 2 beschrieben, von Material, Größe und Form dieser Objekte bestimmt. Eine Konsequenz daraus ist die stark leuchtende Farbe plasmonischer Nanopartikel in Lösungen. Die spektralen Eigenschaften, die die Farbe der Partikel bestimmen, können während der Herstellung durch die Einstellung der oben genannten Parameter festgelegt werden. Die Transmission sowie die Streuung wird dabei mit größer werdenden Partikeln zu höheren Wellenlängen verschoben. Durch die Verwendung komplexerer Formen entstehen zusätzliche Resonanzen, mit denen sich die optischen Eigenschaften über den ganzen Spektralbereich einstellen lassen. Durch das Material können in Abhängigkeit von der dielektrischen Funktion weitere Spektralbereiche erschlossen werden.

Da sphärische Gold- und Silbernanopartikel in verschiedenen Größen den Standard für plasmonische Partikel darstellen und auch für die hier entwickelte Hybridnanostrukturen verwendet werden, sollen die Eigenschaften dieser Partikel in diesem Abschnitt näher erläutert werden. In Abb. 4.2(a) ist der Zusammenhang zwischen der Extinktion und dem Durchmesser von Goldnanopartikeln demonstriert. Aus den in MatLab berechneten Extinktionsspektren ist deutlich zu erkennen, dass mit Zunahme der Partikelgröße das Maximum der Extinktion zu höheren Wellenlängen verschoben wird. Des Weiteren nimmt die Extinktion an Intensität zu. Im rechten Teil der Abbildung sind Spektren von Goldnanopartikeln mit einem Durchmesser von  $d = 60$  nm und  $d = 15$  nm aufgetragen, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurden. Diese Goldnanopartikel zeigen ihr Extinktionsmaximum bei 531 nm im grünen Bereich des Spektrums. Bei Silbernanopartikeln Abb. 4.2(b) liegt dieses Maximum im blauen Bereich des Spektrums, wie auch in den Spektren der Partikel auf der rechten Seite zu sehen ist. Zusätzlich lässt sich an Abb. 4.2(b) die Entstehung zusätzlicher Maxima mit zunehmender Partikelgröße verfolgen. Diese Maxima entstehen durch die Anregung von Multipolen im Partikel. Das lässt sich im Diagramm Abb. 4.2(b)(links) an den Streifen im Diagramm erkennen, wenn zum Beispiel Partikel größer als 120 nm betrachtet werden. Eine Messgröße, die zur Bewertung von Nanopartikeln herangezogen werden kann, ist der Streuquerschnitt. Mit dem Streuquerschnitt kann die Stärke der Streuung eines einzelnen Partikels beschrieben werden. Damit ist der Streuquerschnitt ein Äquivalent zu der oben angegebenen Extinktion. Aufgrund des großen Streuquerschnitts eignen sich gerade größere Nanopartikel für die Anwendung als optische Signalgeber in der mikroskopischen Bildgebung.





(a) Extinktion von Goldnanopartikeln berechnet mit MatLab und Spektren der verwendeten Nanopartikel



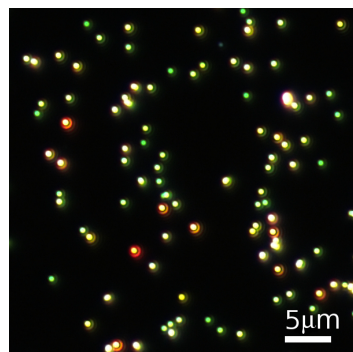
(b) Extinktion von Silbernanopartikeln berechnet mit MatLab und Spektren der verwendeten Nanopartikel

Abb. 4.2: Extinktion von Gold- und Silbernanopartikeln

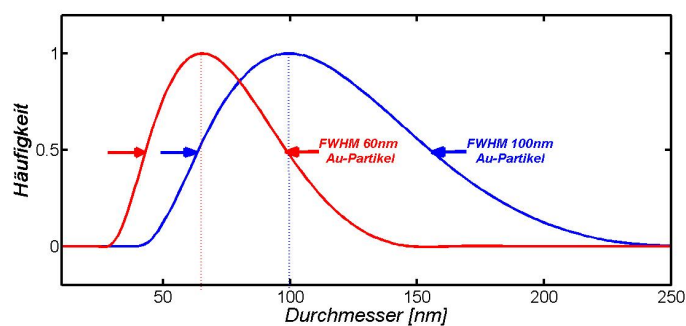
So liefern Goldpartikel ab einem Durchmesser von 30 nm einen gerade noch ausreichenden Kontrast, um in einer Dunkelfeldanordnung (Durchlicht) an Luft sichtbar gemacht werden zu können. Dem gegenüber liefern Partikel größer als 80 nm deutlich mehr Kontrast und sind im Dunkelfeld als grüne Punkte zu erkennen (Abb. 4.3(a)).

Ein Nachteil größerer Nanopartikel besteht allerdings in der Abnahme der Homogenität, was eine breitere Größenverteilung zur Folge hat. Die herstellungsbedingte breite der Verteilung der Partikelgrößen, die um einen statistischen Mittelwert schwankt, wird, wie aus Abb. 4.3(b) zu sehen ist, mit zunehmendem Durchmesser größer. Die Größen der Partikel wurden mittels Dynamic Light Scattering - dynamische Lichtstreuung (DLS) bestimmt. Dabei wird aus den statistischen Schwankungen im Streulicht auf die Größe der in Lösung vorhandenen Partikel zurückgeschlossen und eine Größenverteilung errechnet.

Die Vergrößerung der Durchmesser führt zusätzlich zur Zunahme von Formfehlern (Abb. 4.4), das heißt, dass die Nanopartikel von der gewünschten sphärischen Form abweichen und andere Formen wie Dreiecke oder Ellipsoide ausbilden. Die Verschlechterung lässt sich am besten verdeutlichen, wenn in der Größenverteilung der Partikel die Breite bei halben Maximum (FWHM - *Full Width at Half Maximum*) betrachtet wird. Bei einem Partikeldurchmesser von 60 nm beträgt die FWHM



(a) Dunkelfeldbild von 80 nm großen Nanopartikeln



(b) Größenverteilung von Nanopartikeln

Abb. 4.3: Vergleich der Größenverteilung von Goldnanopartikeln

ungefähr 55 nm, während sie bei einem Durchmesser von 100 nm bereits bei ca. 96 nm liegt. Die Breite der Verteilung macht deutlich, dass eine große Anzahl von Nanopartikeln von der vorgegebenen Größe abweicht und dass diese Abweichung mit zunehmender Größe steigt. Da aber der Partikeldurchmesser, also die Größe, ein zentraler Parameter für die Plasmonenresonanz ist, führen Abweichung zu einem verbreiterten Spektrum bei der Messung von Nanopartikelensemblem und zu einer breiten Statistik im Fall der Messung einzelner Nanostrukturen. Weiterhin ist zu bemerken, dass die Verteilung nicht symmetrisch ist. Dies ist in der Herstellung in der Nanopartikel begründet. Die Partikel wachsen aus kleinen Keimen und sie wachsen solange, bis das Reaktionsmaterial aufgebraucht ist. Da die Wachstumsgeschwindigkeit nicht für alle Partikel gleich ist, können schneller wachsende Partikel größer werden als langsamer wachsende. Aber durch den kontinuierlichen Wachstumsprozess gibt es nach Abschluss einer Reaktion weniger kleine Partikel als große. Neben dem Einfluss der Größe der Nanopartikel auf das Spektrum,

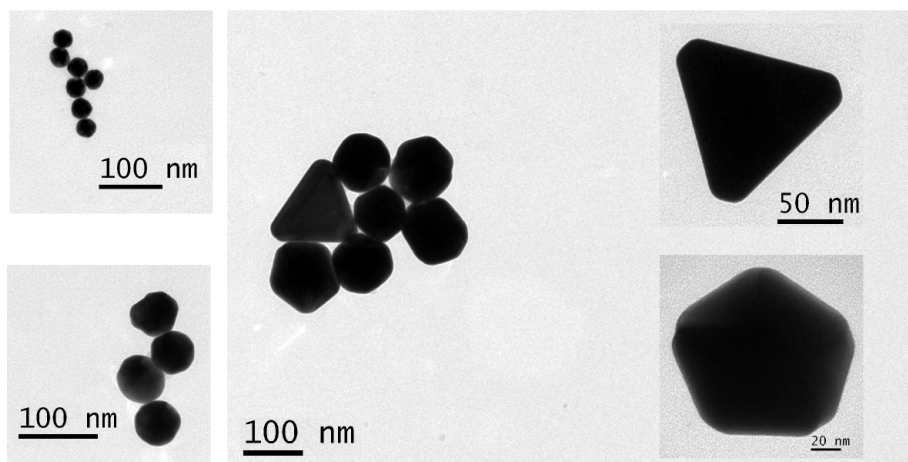


Abb. 4.4: Partikelformen bei unterschiedlichen Größen; links: 30 nm(oben) und 60 nm(unten); Mitte: 100 nm; rechts: ungewollte nichtsphärische Partikel

lassen sich durch die Verwendung anderer Materialien wie Metalle oder Edelmetalle andere Wellenlängenbereiche erschließen. Ein Beispiel dafür ist Silber. Wie in Abb. 4.2(b) dargestellt, liegt die Resonanz von Silberpartikeln im blauen Bereich des Spektrums. Aufgrund der geringen

dielektrischen Verluste im Silber besitzen diese Partikel eine stärkere Resonanz, was sie zu einer Alternative zu Goldpartikeln im Hinblick auf die Anwendung als Signalgeber in der Bioanalytik macht. Zusätzlich wird durch die unterschiedlichen Resonanzwellenlängen unterschiedlicher Nanopartikel ein Multiplexing verschiedener Nachweisreaktionen möglich. Als Multiplexing wird ein Test bezeichnet wenn auf einem Sensorsubstrat auf unterschiedliche Erkennungsreaktionen getestet werden (z.B. unterschiedliche DNA-Sequenzen). Dabei müssen die Signale der einzelnen Sensoren für die unterschiedlichen Reaktionen deutlich voneinander getrennt werden können. Das kann zum Beispiel durch unterschiedliche Plasmonenresonanzen verschiedener Partikel realisiert werden.

Ein großer Nachteil von Silbernanoartikeln besteht jedoch in der starken Alterung der Partikel und deren Inkompatibilität mit biologischen Proben. Die Alterung von Silbernanoartikeln an Luft ist ein bekanntes Phänomen, das die Arbeit mit diesen Nanopartikeln erschwert. Während des Alterungsprozesses oxidiert das Silber und mit dieser stofflichen Veränderung ändert sich die dielektrische Funktion und somit auch die Plasmonenresonanz. Eine Validierung der Messungen wird durch die sich verändernden Partikel erschwert, da sich dadurch auch die Messgröße<sup>1</sup> verändert.

Neben Material, Größe und Form der Nanopartikel können auch Materialkompositionen die spektralen Eigenschaften plasmonischer Nanopartikel stark beeinflussen. Insbesondere die sogenannten bimetallische Kern-Hülle-Nanopartikel liefern bei geeigneter Wahl der Materialien eine Kombination der einzelnen Plasmonenresonanzbanden. Diese Art von Partikeln entsteht, wenn auf einem bereits vorhandenen Kern eine neue Schicht Metall abgeschieden wird. Dabei liefert die Kombination aus Goldkern und Silberhülle im Nanometermaßstab eine besonders starke Wechselwirkung der Materialien in Bezug auf die spektralen Eigenschaften. Die Anwendung dieser Art von Partikeln wird im Kap. 4.3.2 demonstriert. Dort werden solche Partikel im Nanohole hergestellt. Die Herstellung erfolgt durch das Abscheiden einer Silberschicht an einem im Loch vorhandenen Goldnanopartikel. Durch die Variation der Schichtdicke kann die Resonanzwellenlänge verschoben werden. Allerdings tritt die Wechselwirkung des Kerns mit der Hülle aufgrund der Eindringtiefe elektromagnetischer Felder in Silber nur bis zu einer Schichtdicke von 7 nm auf. Bei stärkeren Dicken tritt nur noch die Hülle in Wechselwirkung mit dem auftreffenden Licht. Die Wechselwirkung zwischen Kern und Hülle führt zu einer hohen Empfindlichkeit der Partikel gegenüber Veränderungen in der Umgebung. Dieser Effekt ist für die Biosensorik von besonderem Interesse, da die starke Reaktion auf Änderungen im lokalen Brechungsindex die Partikel zu einem sehr sensitiven Sensorelement macht.<sup>[119]</sup>

Die Plasmonenresonanz kann neben Größe und Material der Nanopartikel auch durch die Form der Nanopartikel geändert werden. Dazu werden anisotrope Formen von Nanopartikeln hergestellt. Diese besitzen eine hohe Sensitivität gegenüber Änderungen im lokalen Brechungsindex und machen sie damit zu sehr guten Transducern für die Bioanalytik. Nanopartikel sind der eigentliche Transducer in der in dieser Arbeit untersuchten Hybridnanostruktur. Um die Empfindlichkeit dieser Struktur zu erhöhen, wurden anisotrope Nanopartikel für eine mögliche Verwendung in der Hybridnanostruktur untersucht. Anisotrope Nanopartikel besitzen aufgrund ihrer Form eine hohe Sensitivität gegenüber Änderungen in der Umgebung und bieten so die Möglichkeit, die sensorischen Eigenschaften der Hybridnanostruktur weiter zu verbessern. Ein Beispiel hierfür sind Nanoprismen nach Aherne<sup>[108]</sup> aus Silber. Diese Prismen sind nur wenige Nanometer hoch und weisen eine Kantenlänge von 20 nm bis 200 nm auf. Die Größe der Prismen wird bereits bei der Herstellung durch die Menge an Keimpartikeln (seeds) eingestellt. In Abb. 4.5 sind die Spektren verschieden großer Silberprismen dargestellt, die aus derselben Keimlösung hergestellt wurden, wobei die Konzentration der Keime geändert

<sup>1</sup>Verschiebung der Peakwellenlänge, siehe auch Kapitel 2.1.2

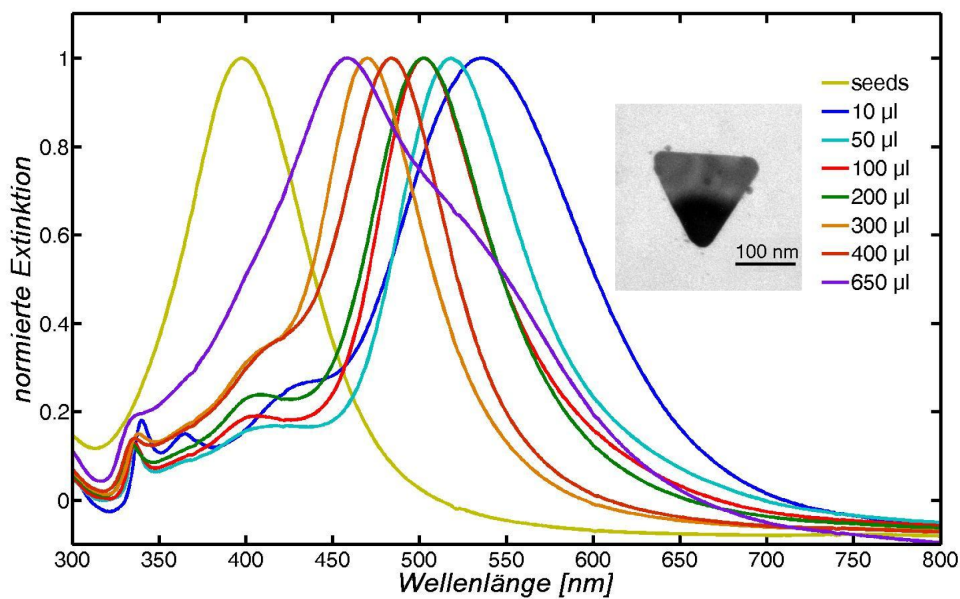


Abb. 4.5: Spektrale Eigenschaften von Silbernanoprismen

wurde. Diese selbsthergestellten Nanoprismen wurden mittels UV-VIS-Spektroskopie in der Lösung auf ihre spektralen Eigenschaften untersucht. Daraus ist ersichtlich, dass durch die Modifizierung der Prismengröße die Plasmonenresonanz von 450 nm bis ins nahe Infrarot eingestellt werden kann. Dabei ergibt eine hohe Konzentration an Keimen ( $650 \mu\text{l}$ ) sehr kleine Prismen, deren Resonanz noch sehr nah an denen von sphärischen Partikeln liegt. Eine geringe Konzentration ( $10 \mu\text{l}$ ) an Keimen führt hingegen zu großen Prismen, wodurch die Plasmonenresonanz in Richtung höherer Wellenlängen, das heißt in den roten Bereich des Spektrums, verschoben wird.

Plasmonische Nanopartikel sind eine Komponente der neuen Hybridnanostruktur und bestimmen so maßgeblich deren optischen Eigenschaften. Die optischen Eigenschaften der Partikel korrelieren stark mit den geometrischen Parametern wie Durchmesser und Kantenlänge. Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zeigen, dass selbst bei kommerziellen Nanopartikeln große Unterschiede in Form und Größe auftreten. Diese Unterschiede in der Größenverteilung bewirken auch eine starke Streuung der Plasmonenresonanz der einzelnen Partikel. Dieser Einfluss macht sich bei Ensemblemessungen nur durch breitere Plasmonenpeaks, im Gegensatz zu denen aus der Theorie berechneten Plasmonenpeaks, bemerkbar. Dramatischer wirkt die Größenverteilung, wenn einzelne Spektren von einzelnen Nanopartikeln verglichen werden. Dabei führt die Größenverteilung der Partikel zu sehr unterschiedlichen Spektren und damit auch zu sehr unterschiedlichen optischen Eigenschaften in der Hybridnanostruktur. Diese Unterschiede machen eine statistische Betrachtung der spektralen Messungen notwendig.

Anhand der Silbernanoprismen konnte gezeigt werden, dass die Größe und damit die spektralen Eigenschaften im Herstellungsprozess eingestellt werden können. Der Vorteil der Silbernanoprismen liegt in der einfachen Herstellung und der Bandbreite, in dem die spektralen Eigenschaften eingestellt werden können. Damit lassen sich auch die Eigenschaften der Hybridnanostruktur spektral verändern und somit andere Spektralbereiche für die Hybridnanostruktur erschließen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche Partikel sich durch ihre plasmonischen Eigenschaften für die Anwendung in der neuentwickelten Hybridnanostruktur eignen und wie sich gezielt die plasmonischen

Eigenschaften beeinflussen lassen, um eine bestimmte spektrale Charakteristik zu erreichen. Auch konnte aufgezeigt werden, wie Abweichungen in Parametern wie Größe und Form sich auf die spektrale Charakteristik einzelner Nanopartikel auswirkt und damit die Statistik der gemessenen Werte einzelner Nanostrukturen beeinflusst.

## 4.2 Herstellung und charakteristische Eigenschaften von Chrom-Nanoholes

Die zweite Komponente, die bei der Herstellung der untersuchten Hybridnanostruktur eine wichtige Rolle spielt, sind Nanoholes. Diese Löcher bilden eine optische Maske, mit denen sich dann Nanopartikel beleuchten lassen. Das Chrom wirkt dabei stark dämpfend auf das Licht. Daher ist es notwendig, zu untersuchen, mit welchen Parametern, die Nanoholes eine optimale Beleuchtung der Nanopartikel zulassen und so einen sensitiven Biosensor schaffen. Nanoholes sind nanostrukturierte Löcher mit einem Durchmesser von 200 bis 300 nm in einem optisch dichten Chromfilm auf einem Quarzsubstrat. Diese Löcher liegen aufgrund ihrer geometrischen Dimensionen am unteren Limit dessen, was noch mit optischer Mikroskopie detektiert werden kann. Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit den Eigenschaften von Nanoholes. Dazu gehören neben den geometrischen Eigenschaften wie Tiefe und Durchmesser vor allem die optischen Eigenschaften, die aus der Veränderung der geometrischen Parameter entstehen.

Die Nanoholes können, wie schon in Kapitel 2.3 beschrieben, auf unterschiedlichen Wegen hergestellt werden. In dieser Arbeit wurden Versuche zu verschiedenen Herstellungstrategien durchgeführt. So wurden Strukturen mittels FIB und CL hergestellt. Mit diesen Methoden konnten zwar Nanoholes erfolgreich hergestellt werden, aber diese Herstellungsmethoden erwiesen sich als zu aufwendig und die Strukturen waren nicht ausreichend reproduzierbar. Aus diesem Grund wurde zur Herstellung der Nanoholes auf die EBL als Methode der Wahl zurückgegriffen. Alle im Folgenden vorgestellten Nanoholes sind mittels EBL hergestellt worden.

Um die Eignung der Löcher zur Verwendung als Teil der Hybridnanostruktur zu untersuchen, wurden diese mittels Rasterkraftmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie analysiert. Diese Charakterisierung ist notwendig, um zum einen das Detektionslimit für die Transmission zu ermitteln und zum anderen um damit Fehler in der Herstellung sowie Änderungen in den Lochparametern wie Tiefe und Durchmesser feststellen zu können. Abb. 4.6 zeigt beispielhaft Topografieaufnahmen von vier Nanoholes, die aus kompletten Nanoholefeldern entnommen sind. Das gemessene Muster enthält dabei  $20 \times 20$  Nanoholes mit einem Abstand von  $2 \mu\text{m}$ . In der Mitte von Abb. 4.6 ist ein Vergleich zwischen einem nicht ausgebildeten Nanohole (oben) und einem optimalen Nanohole (unten) dargestellt. Es ist deutlich erkennbar, dass das Nanohole im oberen Teil weder eine zylindrische Form besitzt noch überall gleich tief ist. Diese Fehler sind durch Schwankungen in der Belichtung bedingt, machen sich aber erst nach dem Ätzen bemerkbar. Der Fehler konnte komplett beseitigt werden, so dass im rechten Teil der Abb. 4.6 dargestellt, Löcher hergestellt werden konnten, deren Durchmesser reproduzierbar bei ca. 250 nm liegt. Die Tiefe wird durch die Variation der Herstellungsparameter bei der Waferprozessierung beeinflusst. Ein Parameter ist zum Beispiel der Sondenstrom des Elektronenstrahls. Mit diesem Parameter kann die Tiefe der Nanoholes in einem Bereich von 60 nm bis 95 nm eingestellt werden. Weitere Parameter zur Steuerung der Lochparameter sind die Ätzrate und die Abbildung des Elektronenstrahls.

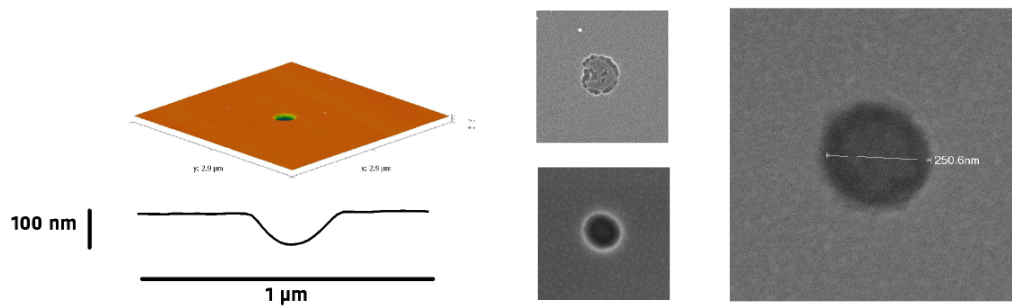


Abb. 4.6: Ultramikroskopische Untersuchungen an Nanoholes mittels AFM (linke Seite) und REM (rechte Seite)

Wie bereits angedeutet, haben Tiefe und Durchmesser der Löcher entscheidende Auswirkungen auf deren optische Eigenschaften. Dabei bestimmt der Durchmesser, welche Wellenlängen durch die Bewegungsbegrenzung transmittiert werden können. Je kleiner der Durchmesser ist, desto weniger Licht wird bei größeren Wellenlängen (im Fall der Nanoholes ab  $\frac{\lambda}{2} \approx 300 \text{ nm}$ ) durchgelassen. Wie schon von Bethe<sup>[15]</sup> und Ebbesen<sup>[16]</sup> festgestellt, skaliert die Intensität der transmittierten Wellenlänge mit  $I \sim 1/r^4$ . Da bei der Prozessierung festgestellt wurde, dass die Durchmesser der Löcher kaum voneinander abweichen, während die Lochtiefe starke Schwankungen aufwies, wurde schließlich letztere genauer betrachtet, um den Einfluss auf die optischen Eigenschaften zu analysieren. Um den Einfluss der Lochtiefe auf die Transmission besser untersuchen zu können, wurden auf einem Quarzsubstrat Löcher mit verschiedenen Tiefen hergestellt. Dazu wurde der Sondenstrom des Elektronenstrahls variiert und so die Belichtungsstärke des Resists verändert, so ergaben sich bei konstanter Ätzzeit Löcher mit unterschiedlicher Stärke. Es zeigte sich, dass die Tiefe des Loches die Intensität des transmittierten Lichts beeinflusst, wobei sich die Stärke der Chromschicht am Boden des Loches als Haupteinflussfaktor herausstellte. Da Chrom eine hohe optische Dichte (bei den verwendeten Maskblanks  $OD \geq 9$ ) hat, wirken sich kleine Schichtdickenvariationen am Boden der Nanoholes stark dämpfend aus. Die Dämpfung wurde systematisch anhand von 4 Parametersets bei der Herstellung der Nanoholes unter Verwendung von AFM, REM und mittels Lichtmikroskopie untersucht. Die entsprechenden Bilder für jeden Parametersatz sind in Abb. 4.7 dargestellt. In der ersten Reihe sind die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen zu sehen. Es zeigt sich, dass mit Zunahme der Nanoholetiefe auch der Lochdurchmesser zunimmt. Die Veränderung in der Tiefe liegt im Bereich von rund 15 nm, wobei die kleinsten Löcher von Typ I eine durchschnittliche Tiefe von 75 nm aufweisen, gefolgt von Typ II mit einer mittleren Tiefe von 85 nm und Typ III und Typ IV mit 89 nm beziehungsweise 90 nm. Die unterschiedlichen Tiefen entstehen durch Ätzen der Chromwafer. Bei einer Tiefe von 86 nm ist das Quarzsubstrat erreicht. Ab diesem Punkt ändert sich die Ätzrate, so dass weniger Material abgetragen wird, was in der zweiten Reihe von Abb. 4.7 zu erkennen ist. Erst ab Typ III ist ein Materialkontrast zu erkennen, der auf einen Glasuntergrund schließen lässt. Der Durchmesser der Nanoholes nimmt nicht weiter zu, jedoch wird von Typ zu Typ die Chromschicht am Boden dünner, bis schließlich das Quarzglas freigelegt wird. Die Verbreiterung der Löcher ist ein unerwünschter Nebeneffekt, der beim Ätzen des Resists auf dem Wafer entsteht.

Die daraus resultierenden optischen Eigenschaften sind in der unteren Reihe von Abb. 4.7 deutlich zu erkennen. Mit zunehmender Tiefe nimmt die Transmission stark zu. Mit Hilfe zweier Messgrößen kann die Varianz der Nanoholes optisch charakterisiert werden. Die erste Messgröße ist die Lumineszenz



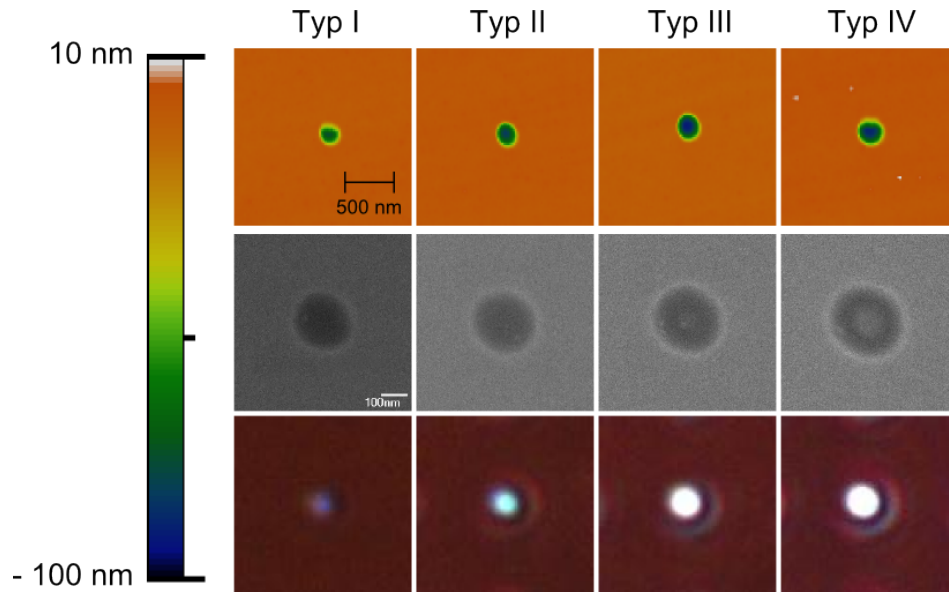


Abb. 4.7: Vergleich verschiedener Nanoheletypen durch AFM, REM, Lichtmikroskopie (Durchlicht-Hellfeld)

Y, welche die Helligkeit der Nanohele beschreibt. Um mögliche externe Einflüsse auszuschließen und eine Vergleichbarkeit der Werte zu ermöglichen, wurden alle Helligkeitswerte auf die Helligkeit des Hintergrundes (Chrom) normiert. Sie stellen damit das Verhältnis zwischen dem durch das Loch transmittierten Licht und der Transmission des Hintergrundes dar. Die zweite Messgröße gibt die Größe der Nanohele im Kamerabild anhand der Pixelfläche an und erlaubt so eine exakte Beschreibung der optischen Eigenschaften und lässt Rückschlüsse auf die geometrischen Parameter zu. Da diese Werte parallelisiert über Bildverarbeitung gemessen werden, können sehr schnell viele Daten gewonnen werden. Auf der linken Seite von Abb. 4.8 ist die statistische Verteilung der Helligkeiten in einem Boxplot dargestellt. Besonders auffällig ist Typ II, da hier die Abweichungen vom Medianwert, der die Daten in zwei Hälften teilt, am größten sind. Eine mögliche Erklärung dafür ist die unvollständige

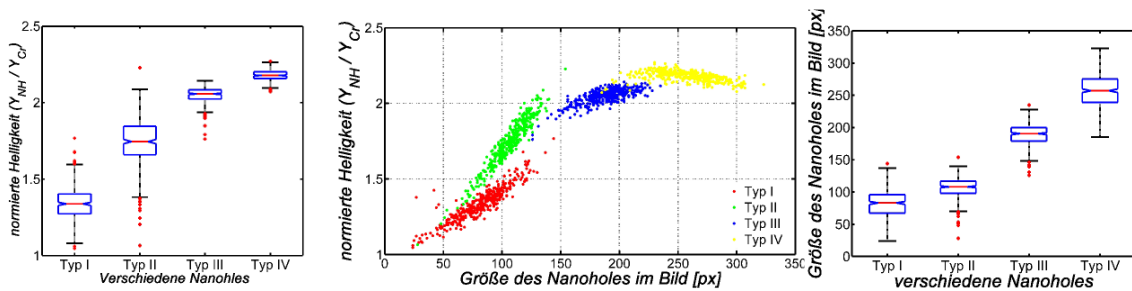


Abb. 4.8: Vergleich der Transmission verschiedener Lochtypen mittels Bildverarbeitung

Ätzung des Chroms, wodurch eine ungleichmäßige Verteilung der Lochtiefe entstehen kann. Anhand des Kamerabildes ist dieser Effekt gut zu beobachten, da die Helligkeit stärker schwankt als die Größe des Nanoheles im Bild (Abb. 4.8). Die Variationen in der Lochtiefe entstehen aufgrund der schlecht reproduzierbaren Kontrolle des Ätzprozesses über die Ätzzeit. Normalerweise wird der Ätzprozess über die Abnahme der Masse der zu ätzenden Stoffe gesteuert und über ein Massenspektrometer gemessen. Bei der Herstellung von Nanoheles wird jedoch sehr wenig Material abgetragen, somit

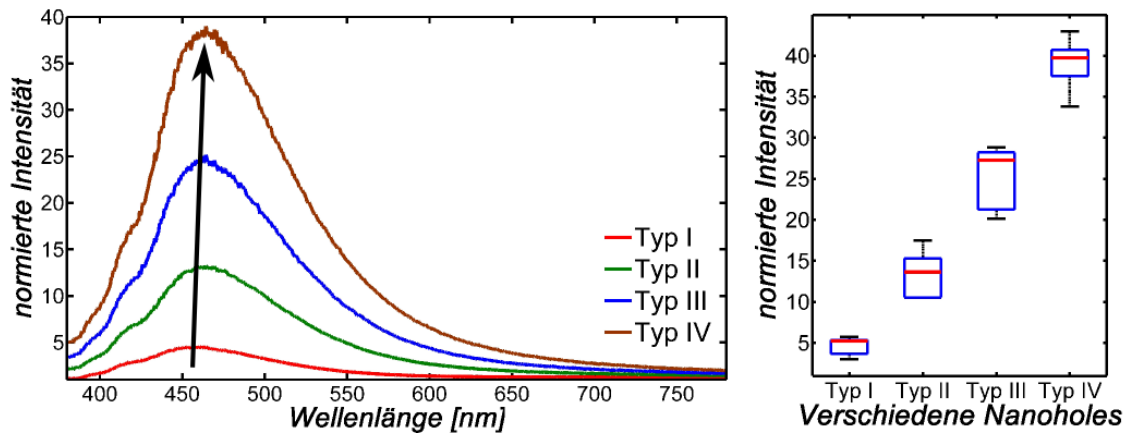


Abb. 4.9: Beugungsbegrenzte Transmission von Nanoholes in Abhängigkeit von der Nanoholedimension (Tiefe, Durchmesser)

ist eine Kontrolle z.B. mit einem Massenspektrometer nicht geeignet. Beim Ätzen treten zu dem Anisotropien an einzelnen Löchern auf, die zu unterschiedlichen Tiefen führen und somit das optische Signal stark beeinflussen können. Ist das Glassubstrat einmal erreicht, macht sich dieser Faktor jedoch nur noch sehr wenig bemerkbar. In den Bilddaten ist dieser Effekt eher undeutlich zu erkennen, da ab einer bestimmten Helligkeit der Dynamikbereich der Kamera für ein Bild mit einer Digitalisierungstiefe von 24 Bit erschöpft ist und die Pixel nur noch als Weiß dargestellt werden. Aus diesem Grund sind Typ III und IV nur schwer voneinander zu unterscheiden. Als zusätzliches Unterscheidungsmerkmal wurde daher die Größe des Loches im Kamerabild bestimmt. Auch dieser Parameter ist proportional zur Intensität der Transmission. Aufgrund der Beugung, die an den Nanoholes auftritt, nimmt der Durchmesser der Abbildung im Mikroskop zu. Wird der Größenparameter mit einbezogen, können, wie rechts in Abb. 4.8 zu sehen, vier Cluster klar voneinander getrennt werden. Dadurch wird eine spätere Abschätzung der Lochtiefe aus dem Kamerabild relativ einfach möglich.

Die Abschätzung der Korrelationskoeffizienten für die gewonnenen Daten und der gemessenen Lochtiefe deutet sowohl auf einen linearen Zusammenhang zwischen Lochtiefe und Helligkeit im Kamerabild als auch zwischen Lochtiefe und Größe hin. Die Koeffizienten liegen bei  $corr = 0,98$  für den Zusammenhang zwischen normierter Helligkeit und Lochtiefe und bei  $corr = 0,88$  für die Lochtiefe und Lochgröße im Bild.

Die Änderung der Lochparameter aus dem Herstellungsprozess, die im Nachhinein mit dem AFM gemessen wurden, lässt sich zusätzlich sehr gut spektral verfolgen. Anhand von Abb. 4.9 wird deutlich, dass sowohl die Intensität als auch die spektrale Breite mit zunehmender Tiefe zunimmt. Die spektrale Verschiebung der Maxima ist die Folge der Verbreiterung der Löcher mit zunehmender Tiefe. Ein weiteres Indiz für die Verbreiterung der Löcher ist die Verbreiterung des Peaks im Spektrum. Normalerweise ist bei einer beugungsbegrenzten Transmission kein Abfall der Intensität bei kleineren Wellenlängen zu erwarten, was vor allem an der verwendeten Normierung liegt. Dabei wird auf ein gemessenes Chromspektrum normiert, um die Effekte an den gemessenen Spektren zu unterdrücken. Chrom hat die Eigenschaft, bei niedrigen Wellenlängen eine sehr hohe optische Dichte zu besitzen, was bei der Normierung zu einem Peak anstelle eines einfachen Abfalls führt. Dieses Verhalten wird auch durch Simulationen gestützt, welche zur Hybridnanostruktur erstellt wurden (siehe Kap. 4.3.2). Des Weiteren zeigen statistische Betrachtungen, dass auch spektral eine klare Unterscheidung



vorgenommen werden kann. Da das Spektrometer einen höheren Dynamikbereich als die Kamera besitzt, können die Intensitätsunterschiede für alle Nanoheletypen ohne Übersteuerung aufgenommen werden.

Beide Methoden der Informationsgewinnung, sowohl die Methode der Bildverarbeitung als auch der Erhalt spektraler Informationen aus mikrospektroskopischen Messungen, bieten unterschiedliche Möglichkeiten, um optische Eigenschaften von Nanoheles exakt zu charakterisieren. Die Daten der Bildverarbeitung liefern aufgrund der parallelen Datengewinnung eine hohe Dichte an Informationen mit breiter Statistik innerhalb eines vergleichsweise kurzen Zeitraumes. Jedoch fehlt hier die nötige Detailtiefe, um alle Eigenschaften ausreichend beschreiben zu können. Auf der anderen Seite besitzen die spektralen Daten zwar eine sehr hohe Detailtiefe, jedoch können die Daten nur seriell gewonnen werden, was einen hohen zeitlichen Aufwand verursacht. Wie das obige Beispiel zeigt, ist die parallele Anwendung beider Methoden vorteilhaft, da sich die Daten beider Verfahren ergänzen und somit bei geringerem Zeitaufwand eine hohe Informationsdichte gewonnen werden kann.

Da zu dieser Art von Nanoheles bisher nur wenige Untersuchungen<sup>[23]</sup> vorliegen und diese Untersuchung auch nicht den in dieser Arbeit genutzten Spektralbereich abdecken, mussten diese Nanohele erst im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen aufwendig in ihren Eigenschaften charakterisiert werden. In dieser Arbeit wurden die verschiedenen Aspekte der nicht plasmonischen Nanoheles aus Chrom untersucht. Durch einen Eingriff in den Herstellungsprozess konnte die Transmission der Löcher geändert und die optimalen Parameter bestimmt werden. Weiterhin wurden verschiedene Möglichkeiten der Datengewinnung genutzt und die Daten aus den AFM-Messungen mit den optischen Daten abzugleichen. Dabei erwies sich neben den mikrospektroskopischen Messungen die Bildverarbeitung als nützliches Werkzeug. Es stellte sich heraus, dass die Dicke der Restchromschicht mit der Transmission der Nanoheles korreliert und damit wesentlich deren optische Eigenschaften bestimmt. Dadurch lässt sich die Transmission der Löcher durch deren Durchmesser sowie durch die Ätztiefe im Chrom einstellen. Die so im Rahmen dieser Untersuchungen gewonnen Erkenntnisse werden zur weiteren Charakterisierung der neuen Hybridnanostruktur genutzt.

### 4.3 Kombination von Nanoheles mit Nanopartikeln

Im Ergebnis der vorangegangenen Untersuchungen wurde eine Hybridnanostruktur neu entwickelt - bestehend aus nicht plasmonischen Nanoheles und Edelmetallnanopartikeln besitzt diese Struktur optische Eigenschaften - die sie zu einer interessanten Plattform für die Bioanalytik machen könnten. Das besondere an dieser Struktur ist, dass die Nanoheles als optische Maske wirken und somit eine sensitive Dektektion der Plasmonenresonanz im Durchlicht ermöglichen. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Herstellung, Charakterisierung sowie die Eignung zur Anwendung dieser Nanostruktur in der Bioanalytik vorgestellt. Ziel der Herstellung ist es, eine definierte Anzahl von Partikeln im Nanohele zu platzieren, das heißt, den Prozess zur Immobilisierung gezielt zu steuern, um so eine hohe Anzahl von Nanoheles mit einer definierten Anzahl von Partikeln herstellen zu können. Bei der Charakterisierung der optischen Eigenschaften wurde vordergründig der Einfluss unterschiedlicher Nanopartikelpopulationen auf Hybridnanostrukturen untersucht und daraus resultierend die Eignung für die Bioanalytik abgeschätzt.

### 4.3.1 Strategien zur kontrollierten Integration von Nanopartikeln in Nanoholes

Zur Herstellung von Hybridnanostrukturen wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt: die chemisch geleitete Selbstorganisation von Nanopartikeln in modifizierten Nanoholes sowie die biomolekülvermittelte Selbstorganisation. Selbstorganisierende Nanostrukturen werden dabei generell über die gezielte lokale Veränderung der Oberflächeneigenschaften hergestellt. Die so induzierten Veränderungen führen zu unterschiedlich erzeugten Messsignalen. So kann einerseits das Entstehen der Nanostruktur ein optisches Messsignal liefern, wie es bei Biochips der Fall ist. Andererseits kann auch die entstandene Struktur als Signalgeber fungieren, zum Beispiel als DNA-Biosensor. Dabei kommt es vor allem darauf an, die Parameter der Selbstorganisation so zu beeinflussen, dass zum einen die Nanoholes gleichmäßig mit Nanopartikeln befüllt werden und andererseits ein geringes Hintergrundsignal entsteht. Das bedeutet, dass nur wenige oder gar keine Partikel auf der Oberfläche liegen sollen, die das optische Signal verändern könnten.

Erste Immobilisierungsversuche haben gezeigt, dass die Kontrolle dieses Prozesses nur sehr unzureichend ist. Die Partikel waren nach der Immobilisierung zufällig auf der Oberfläche verteilt, ohne dass eine bevorzugte Immobilisierung in den Nanoholes erkennbar war. Eine Optimierung des Prozesses zur Herstellung der Hybridnanostrukturen wurde daher angestrebt. Im ersten Schritt wurde eine Aktivierung der Substrate<sup>2</sup> durchgeführt. Diese Aktivierung erfüllt zwei Aufgaben: Noch auf der Oberfläche befindliche organische Verunreinigungen werden durch die Aktivierung entfernt, wodurch wiederum die Benetzungseigenschaften der Oberfläche gezielt geändert werden können. Die Aktivierung der Oberfläche kann sowohl über chemische als auch physikalische Verfahren erfolgen. Beide Verfahrensprinzipien führen zu adäquaten Ergebnissen mit nur geringen Unterschieden im Wirkungsgrad. Eine chemische Aktivierung dauert länger und die Aktivität der Oberfläche nimmt schneller ab. So zeigt die Messung der Kontaktwinkel als qualitative Messgröße für die Veränderung der Oberflächeneigenschaften, dass nach 1h chemischer Aktivierung der Kontaktwinkel 15° bis 20° beträgt. Bei einer physikalischen Aktivierung wird schon nach 15 min ein nicht mehr messbarer Kontaktwinkel ( $\alpha \leq 10^\circ$ ) erreicht. Deswegen wurde bei der Aktivierung hauptsächlich auf die physikalische Aktivierung zurückgegriffen.

Durch die Aktivierung werden an der Oberfläche Sauerstoffverbindungen aufgebrochen und damit reaktive  $[-OH]$  Gruppen erzeugt, was zu einer deutlichen Abnahme des Kontaktwinkels von Wasser an der Oberfläche und damit zu einer verringerten Oberflächenspannung an den Phasengrenzen führt. Beim Eintrocknen von Flüssigkeitstropfen spielen gerade diese Oberflächenspannungen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von verschiedenen Effekten an der Oberfläche. Ein Effekt, der beim Eintrocknen auftritt und damit gezielt beeinflusst werden kann, ist der sogenannte „Kaffeerandeffekt“.<sup>[120]</sup> Die Dreiphasengrenze zwischen Luft, Wasser und dem Substrat bildet die Kontaktlinie. Wenn sich diese Linie aufgrund der Oberflächeneigenschaften nicht bewegen kann und der Tropfen verdunstet, setzt nach dem Satz der Energieerhaltung eine Strömung in Richtung Kontaktlinie ein. Die Partikel, die sich in der Flüssigkeit befinden, werden zur Kontaktlinie transportiert und bleiben dort an der Oberfläche liegen. Das bewirkt zum Beispiel eine unkontrollierte Immobilisierung von Goldnanopartikeln auf der Chromoberfläche. Durch die gezielte Modifizierung der Oberflächeneigenschaften wird dieser Effekt minimiert und die Immobilisierung erfolgt kontrollierter. Abb. 4.10 zeigt den Effekt der physikalischen Oberflächenaktivierung. In Abb. 4.10 (a) ist der natürliche Kontaktwinkel ( $\alpha$ ) von Wasser auf Chrom zu sehen, der bei ca. 75° – 90° liegt. Nach

<sup>2</sup>Vgl. Kap. 3.3.2

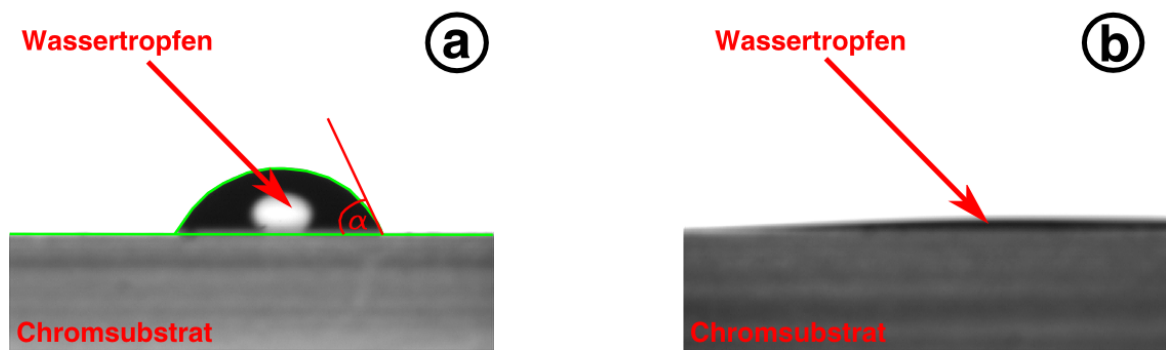


Abb. 4.10: (a) Natürlicher Kontaktwinkel einer Chromoberfläche (b) Kontaktwinkel der Chromoberfläche nach dem Plasmaätzen

dem Plasmaätzen ist der Kontaktwinkel kleiner  $10^\circ$ , so dass eine Messung des Kontaktwinkels mit dem Kontaktwinkelmessgerät unmöglich ist. Durch den niedrigen Kontaktwinkel wird bei der Immobilisierung der Nanopartikel das Anheften (Pinning) der Kontaktlinie minimiert. Damit lassen sich die Partikel gezielter in die Nanoholes einbringen und die Anzahl der Partikel auf der Oberfläche minimieren.

Allerdings nimmt die Aktivierung der Oberfläche über die Zeit ab, so dass die Immobilisierung der Nanopartikel in einem schmalen Zeitfenster erfolgen muss, wenn keine zusätzliche Monolage genutzt wird. Während die aktiven Gruppen auf dem Boden der Nanoholes auf der Glasoberfläche bereits nach ungefähr 10 Minuten verschwunden sind, hält sich die Aktivierung auf einer Chromoberfläche bis zu zwei Stunden (siehe Abb. 4.11).

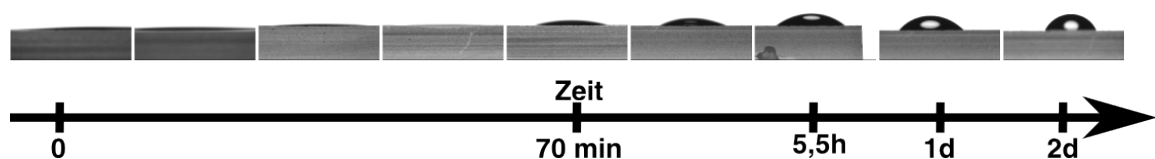


Abb. 4.11: Änderung des Kontaktwinkels auf der Chromoberfläche über die Zeit

Die alleinige Anwendung des Aktivierungsprozesses zur Änderung der Oberflächeneigenschaften des Substrates ist für eine gezielte Immobilisierung der Nanopartikel im Nanohole jedoch unzureichend. In diesem Fall wird die Immobilisierung allein über die Temperatur und relative Luftfeuchte kontrolliert. Jedoch besitzt diese Methode einen niedrigen Wirkungsgrad, weil die Aktivierung von Oberflächen mit unterschiedlichen Materialien aber ähnlichen chemischen Oberflächeneigenschaften (Chrom und Glas), zu ähnlichen Benetzungseigenschaften führt. Zur Immobilisierung in kleinen Strukturen ist ein größerer Unterschied in den Benetzungseigenschaften notwendig. Dieser Unterschied hält die zu immobilisierenden Nanopartikel von der Chromoberfläche fern und erhöht gleichzeitig die Affinität der Nanopartikel zur Glasoberfläche am Boden der Nanoholes. Um unterschiedliche Eigenschaften zu generieren, wurde auf die Technik der selbstorganisierenden Monolagen zurückgegriffen. Diese sind eine Schicht aus Molekülen, die fest mit der darunterliegenden Schicht verbunden sind. Diese Moleküle bestehen im Allgemeinen aus einer Kopfgruppe, die an die Oberfläche anbindet, einer Alkylkette als Abstandhalter und einer funktionellen Endgruppe, die unterschiedliche Eigenschaften bewirken

kann. Moleküle, die sich für selbstorganisierende Monolagen eignen, sind zum Beispiel Alkylthiole wie Mercaptohexanol und Mercaptoundecansäure. Beide Moleküle können auch zusammen als Mischung eingesetzt werden. Aus diesen beiden Molekülen bildet sich dann ein Mischlayer an der Oberfläche, das es erlaubt, gezielt einen bestimmten Kontaktwinkel auf dem Chromsubstrat einzustellen. Der Kontaktwinkel wurde mit Hilfe des Mischlayers auf 60° eingestellt, wobei die Kontaktwinkel im Herstellungsprozess im Bereich von 50° bis 70° variieren.

Im Anschluss daran wurden die Partikelimmobilisierungsschritte durchgeführt. Mit diesen Molekülen konnte nicht verhindert werden, dass zahlreiche Partikel auf der Chromoberfläche unspezifisch gebunden wurden. Eine Vermutung zu dieser unzureichenden Steuerbarkeit der Immobilisierung ist, dass sich die Moleküle Mercaptohexanol und Mercaptoundecansäure unspezifisch an das Chrom und Glas binden und somit die Immobilisierung nicht gezielt genug beeinflussen. Daher wurde nach selbstorganisierenden Monolagen gesucht, die einerseits sehr spezifisch für Chrom sind und andererseits sich nicht an Glas binden. Chromoberflächen sind schwierig zu behandeln, da sie eine native Oxidschicht bildet, die ähnliche Eigenschaften besitzt wie eine Glasoberfläche. Für diese Problematik gibt es spezielle Moleküle wie Phosphonate und Chlorosilane, die sich spezifisch an Chromoberflächen anbinden lassen. Phosphonate wie doPhosAc lassen sich durch ihre Phosphonsäuregruppe sehr gut an metalloxidische Oberflächen anbinden und eignen sich daher sehr gut für Metalloberflächen der Nebengruppen wie Titan, Aluminium oder Chrom. Die Alkylkette erzeugt an der Substratoberfläche hydrophobe Oberflächeneigenschaften, was sich auch deutlich in den gemessenen Kontaktwinkeln zeigt (siehe Abb. 4.12). Der Kontaktwinkel der Chromoberfläche nach der Aktivierung ändert sich

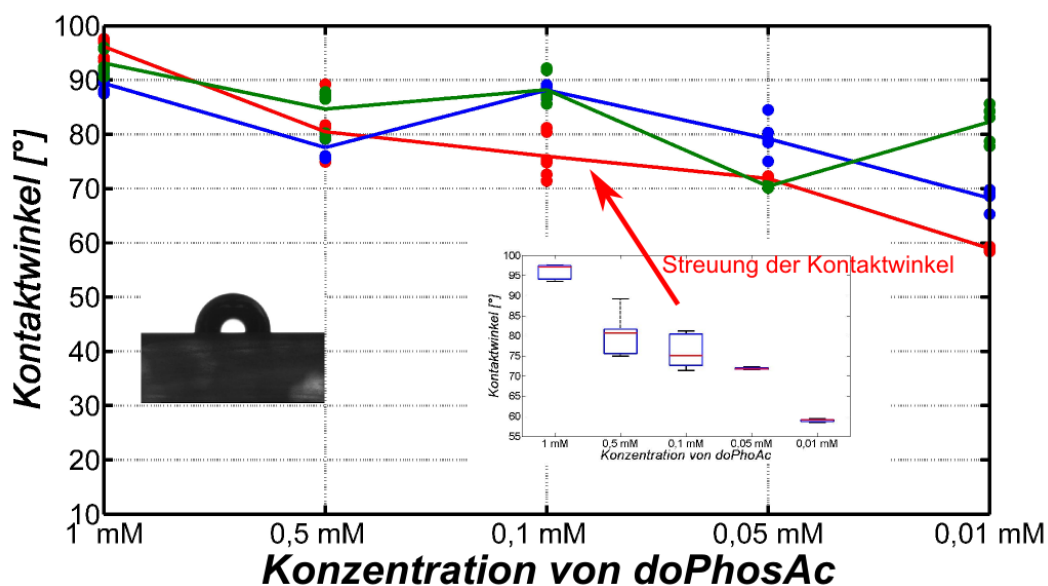


Abb. 4.12: Änderung des Kontaktwinkels durch die Modifizierung mit PhosAc bei unterschiedlich starker Aktivierung (Plasmaleistung: rot  $\hat{=}$  10 W, blau  $\hat{=}$  30 W, grün  $\hat{=}$  50 W )

durch Nutzung der Monolage von stark hydrophil zu stark hydrophob. Dabei zeigte sich, dass mit abnehmender Aktivierung der Oberfläche durch Verringerung der Plasmaleistung und Konzentration der monolagebildenden Moleküle die hydrophoben Eigenschaften der Oberfläche schwächer werden.

Aus diesem Grund wurde eine optimale Konzentration von 2 mM und eine Plasmaleistung von  $\geq 50$  W als optimale Aktivierung festgelegt, um stets eine optimale Monolage zu gewährleisten. Diese optimierten Parameter wurden auch genutzt, um verschiedene Typen von Monolagen auf einem Chip zu realisieren. Dabei war das Ziel, Monolagen mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen auf einem Chip aufzubringen. Durch die unterschiedlichen Funktionalitäten sollen unterschiedliche Oberflächen auf dem Chip angesprochen werden. Dieses stellt einen wichtigen Schritt zur spezifischen Anbindung von Biomolekülen in den Nanoholes dar.

Um Biomoleküle an Glasoberflächen kovalent zu binden, wurde ein Epoxysilan verwendet. Die Glasoberfläche wurde dafür mit (3-Glycidoxypropyl)trimethoxysilan (GOPS) Epoxy modifiziert. Da sich das GOPS auch an die Chromoberflächen binden würde, muss diese Oberfläche geblockt werden, was durch die Anwendung von doPhosAc erreicht wird. Um die optimale Immobilisierungsstrategie zu ermitteln, wurden die Monolagen in verschiedenen Reihenfolgen beziehungsweise als Gemisch immobilisiert. Untersucht wurde dabei, in welchen Schritten die Monolagen immobilisiert werden sollten, um einerseits eine hydrophobe Chromoberfläche zu schaffen, an der sich keine Partikel anlagern, andererseits eine epoxymodifizierte Glasoberfläche für die Bindung von aminomodifizierter DNA zu erhalten.

Um eine solche Modifizierung der verschiedenen Oberflächen zu erreichen, wurden Versuche mit verschiedenen Immobilisierungsreihenfolgen durchgeführt. Dabei wurde nach einem optimalen Protokoll gesucht, bei dem das GOPS allein auf dem Glas bindet, ohne die Chromoberfläche zu beeinflussen. Um die Anbindung der Monolagen zu überprüfen, wurde erneut der Kontaktwinkel von Wasser auf der jeweiligen Oberfläche überprüft. Wie aus Abb. 4.13 und Tab. 4.1 hervorgeht, unterscheiden sich die Kontaktwinkel je nach Prozessierung deutlich voneinander.

Bei der alleinigen Anwendung von GOPS zeigte sich, dass sich auf beiden Oberflächen der Kontaktwinkel in gleicher Weise änderte, während das PhosAc auf den Glasoberflächen kaum eine Änderung bewirkte. Eine natürliche Glasoberfläche besitzt im Vergleich zu einer mit GOPS modifizierten Oberfläche einen sehr niedrigen Kontaktwinkel ( $\leq 30^\circ$ ), während eine mit PhosAc behandelte Oberfläche einen Kontaktwinkel von  $40^\circ$  bis  $60^\circ$  aufweist. Dadurch wird deutlich, dass sich eine Monolage von GOPS auf beiden Oberflächen bildet, noch bevor sich das PhosAc anbinden kann und somit die Oberfläche für PhosAc blockiert wird. Die Mischung beider Monolagen brachte nicht das gewünschte Ergebnis, da sich nur der Kontaktwinkel auf dem Chrom änderte, so dass von einer Anbindung der PhosAc ausgegangen werden kann. Wird zuerst das GOPS an die Oberfläche gebunden und danach PhosAc, so zeigte sich, dass sich das GOPS auch auf die Chromoberfläche bindet. Damit ist eine spezifische Anbindung von Biomolekülen nicht mehr möglich. Die optimale Variante besteht darin, zuerst eine PhosAc-Monolage aufzubringen und anschließend eine GOPS-Monolage zu immobilisieren. Dabei ist die Anbindung von GOPS aufgrund des niedrigeren Kontaktwinkels im Vergleich zu einer reinen Monolage von GOPS auf Glas scheinbar nicht so effektiv, jedoch wird das Chrom vollständig geblockt. Damit konnten erfolgreich zwei Monolagen auf einem Chip mit unterschiedlichen Oberflächen immobilisiert werden und dabei die Oberflächen spezifisch modifiziert werden. Dieses optimierte Protokoll konnte damit für alle weiteren Versuche genutzt werden.

Der nächste Schritt im Herstellungsprozess ist die Immobilisierung der Goldnanopartikel. Ein mögliches Verfahren neben der biomolekülgeführten Immobilisierung ist die unspezifische Immobilisierung mittels eintrocknenden Tropfens. Beide Möglichkeiten wurden bereits in Kap. 2.3.4 und 3.3.3 vorgestellt. Wie schon erläutert, werden neben den Oberflächeneigenschaften auch die Kontrollparameter Temperatur und Luftfeuchtigkeit variiert. Beide Parameter zusammen bestimmen die Geschwindigkeit der Verdunstung und damit den Transport der Nanopartikel innerhalb der

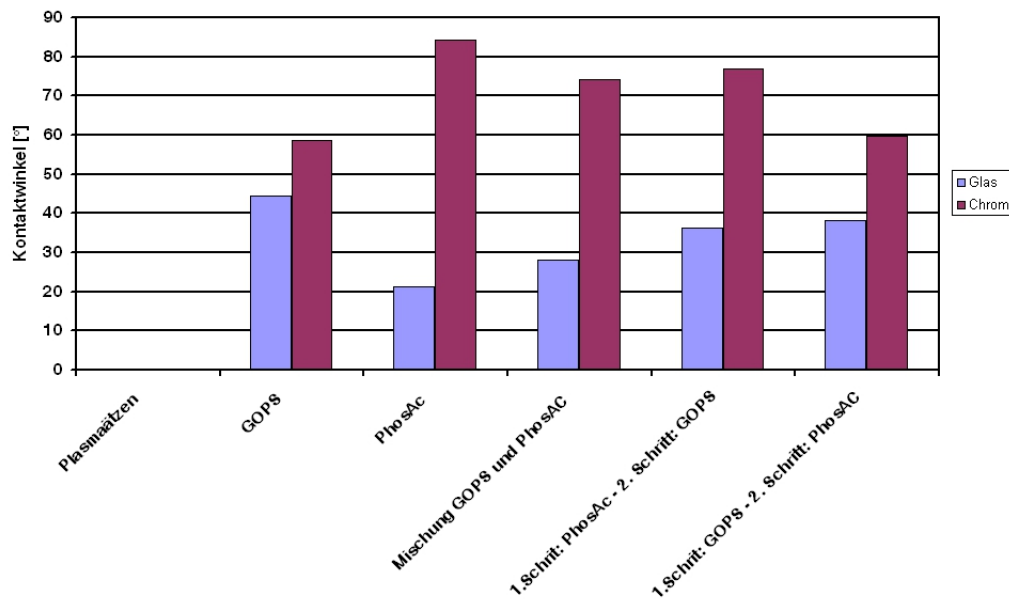


Abb. 4.13: Änderung des Kontaktwinkels durch Kombination verschiedener Monolagen auf Modellsubstraten aus Glas oder Chrom

Prozessierungsschritte	Glasoberfläche	Chromoberfläche
Plasmaätzen	$\leq 10^\circ$	$\leq 10^\circ$
Monolage GOPS	44,5°	58,7°
Monolage PhosAc	21,8°	84,2°
Mischung GOPS und PhosAC	28,1°	74,1°
1. Schritt: PhosAc, 2. Schritt: GOPS	34,4°	76,8°
1. Schritt: GOPS, 2. Schritt: PhosAc	38,3°	59,8°

Tab. 4.1: Änderung des Kontaktwinkels bei der Verwendung von PhosAc und GOPS auf reinen Modellsubstraten

Flüssigkeit. So zeigte sich zum Beispiel, dass bei einer Erhöhung der Temperatur die Anzahl der Partikel auf der Oberfläche abnimmt (Abb. 4.14).

In Abb. 4.15 sind exemplarische Ergebnisse zu den Immobilisierungsversuchen mit 30 nm großen Goldpartikeln dargestellt. Abb. 4.15 (a) und (b) zeigen die REM-Bilder von verschiedenen getesteten Parameterkombinationen, wobei in Pfeilrichtung sowohl Temperatur als auch Luftfeuchte von 30°C auf 60°C beziehungsweise von 10% auf 40% erhöht werden. Bei der Betrachtung des 2D-Parameterraums fällt auf, dass die Ergebnisse stark variieren. Dabei können Variationen wie in Abb. 4.15 (a) dargestellt sowohl innerhalb eines Substrates auftreten als auch bei verschiedenen Oberflächenmodifizierungen (Abb. 4.15 (b), (c)), ohne dass eine generelle Tendenz bei der Immobilisierung erkennbar ist. Bei den Untersuchungen wurde festgestellt, dass auch Variationen in der Partikelanzahl auf einer Probe (Chip) auftreten können. Diese Variationen reichen von einer geringen Anzahl von Partikeln in den Löchern beziehungsweise vielen Partikeln auf der Substratoberfläche bis hin zur nahezu idealen Immobilisierung (Partikel nur in den Löchern). Unterschiede in der Immobilisierung sind auf lokale Änderungen der

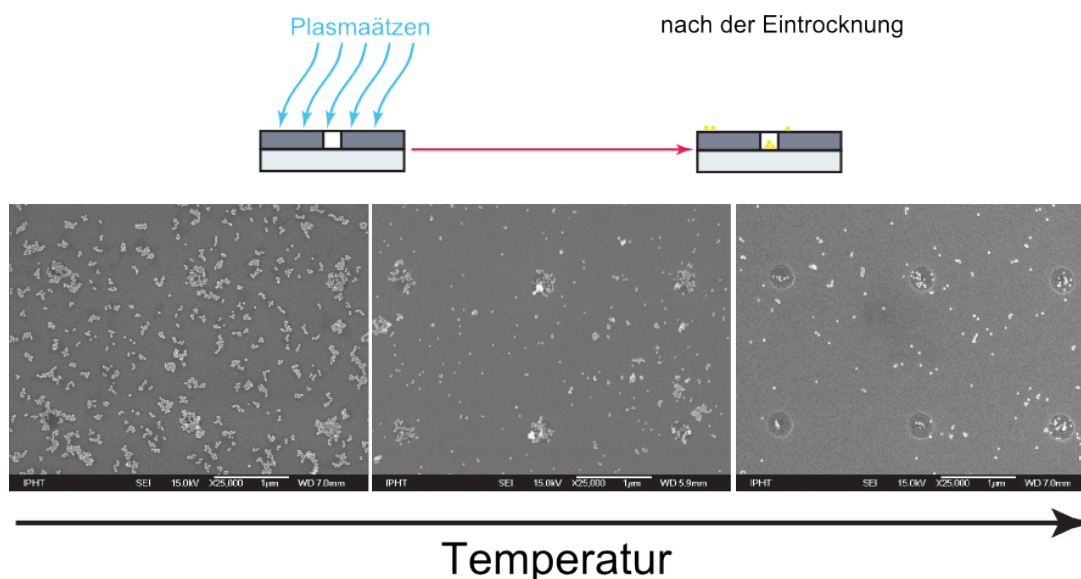


Abb. 4.14: Einfluss der Temperatur auf die Immobilisierung

Oberflächeneigenschaften oder auf Konzentrationsänderungen in der Partikellösung zurückzuführen. Lokale Unterschiede in den Oberflächeneigenschaften lassen sich nur sehr schwer ermitteln, da nicht von den makroskopischen Modifizierungen auf die nanoskaligen Reaktionen geschlossen werden kann. Des Weiteren kann eine Änderung der relativen Partikelkonzentration in der Lösung nicht vollständig ausgeschlossen werden, auch wenn diese durch das an der Unterkante des Substrates entstandene Reservoir (siehe Abschnitt 3.3.3) verhindert werden sollte. In diesem Reservoir befindet sich ein großer Teil der Partikellösung. Diese Lösung verdunstet erst, nachdem die Kontaktlinie die Oberfläche des Substrates verlassen hat. So stabilisiert das Reservoir die Konzentration der Partikellösung. Eine Beeinflussung der Temperatur und Luftfeuchte zeigte bei den Immobilisierungsexperimenten keinen klaren Trend. Allerdings lieferte die Wahl der Parameter mit einer Temperatur von 40 °C und einer relativen Luftfeuchte von 40% die besten Ergebnisse im Hinblick auf die Immobilisierung einer hohen Partikelanzahl in den Nanoholes sowie die Minimierung der Partikelanzahl auf der Substratoberfläche. Der Einsatz von Monolagen aus Mercaptohexanol und Mercaptoundcansäure zeigte ebenfalls keinen eindeutigen Einfluss dieser Moleküle auf den Immobilisierungsprozess im Vergleich zu den Versuchen, bei denen die Oberfläche chemisch oder physikalisch aktiviert wurde. Anders sieht es jedoch bei der Anwendung einer Monolage aus PhosAc aus. Diese bewirkte eine stark hydrophobe Modifizierung der Oberfläche und verhinderte damit die unspezifische Anlagerung von Partikeln auf der Chromoberfläche. Wie in Abb. 4.16 zu sehen ist, war die Anzahl der Partikel auf der Chromoberfläche relativ gering und die Wahrscheinlichkeit der gezielten Immobilisierung der Partikel im Loch stieg. Die Anzahl der Partikel im Nanohole war dabei deutlich von der Größe der Nanopartikel abhängig. So zeigen die Versuche mit 100 nm großen Nanopartikeln eine Vielzahl verschiedener Populationen mit einer Häufung von 3 Partikeln pro Nanohole. Wie schon in Abschnitt 4.1 erläutert, besitzen gerade 100 nm große Nanopartikel eine breite Größenverteilung, so dass diese Abhängigkeit auch bei der Immobilisierung deutlich wird. Die größten Partikel wurden häufig allein in einem Loch immobilisiert, während sich kleinere Partikel häufig zu Dreiergruppen anordneten. Bei mehr als 5 Partikeln kam es allerdings zu einer Schichtung über den Rand des Nanoholes hinaus. Durch den Einsatz von PhosAc konnten vor allem Effekte wie die unspezifische Immobilisierung auf der Oberfläche deutlich minimiert werden. Einflussfaktoren wie Temperatur und Konzentration der Nanopartikel

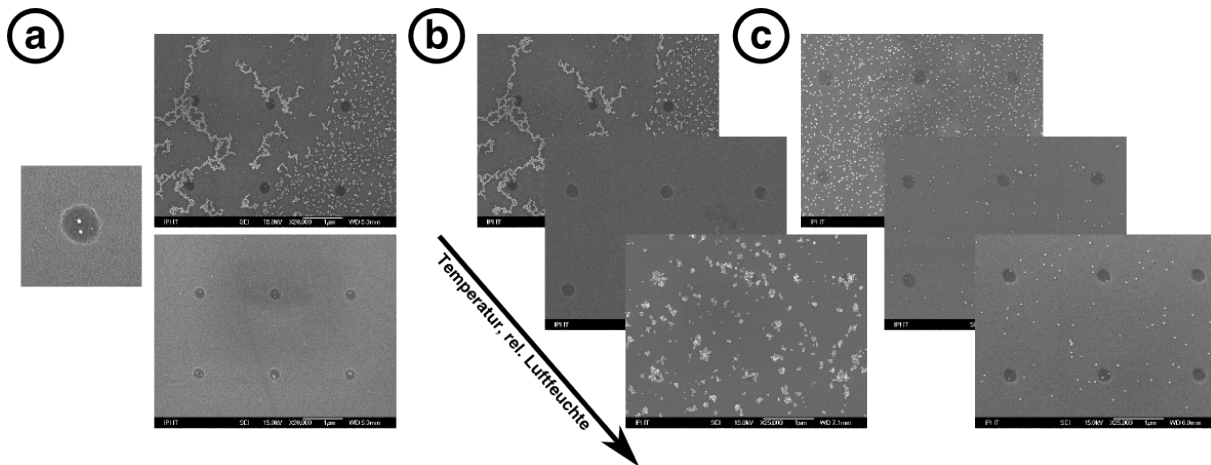


Abb. 4.15: Einfluss von Temperatur und relativer Luftfeuchte auf die Immobilisierung  
(a) Verschiedene Stellen auf dem gleichen Substrat mit unterschiedlicher Immobilisierungseffizienz von ineffektiv bis ideal, (b) Immobilisierung mit steigender Temperatur und Luftfeuchte ohne Monolage, (c) Immobilisierung mit steigender Temperatur und Luftfeuchte mit Monolage Mercaptohexanol

beeinflussten auch beim Einsatz von PhosAc die Immobilisierungsergebnisse. Dabei variierten die Ergebnisse in den unterschiedlichen Regionen auf der Oberfläche eines Substrates deutlich. So wies ein Bereich auf der Oberfläche eine hohe Anzahl immobilisierte Nanopartikel in den Nanoholes auf, während in einem anderen Bereich der Oberfläche kaum unbefüllte Nanoholes zu finden waren. Dennoch ist diese Methode eine einfache und schnelle Möglichkeit, Hybridnanostrukturen zu erzeugen. Andere Arbeiten zur Immobilisierung von Goldnanopartikeln in vorgefertigte Nanostrukturen<sup>[93,97]</sup> liefern zwar bessere Ergebnisse bei der Immobilisierung von Nanopartikeln in Nanostrukturen, aber in diesem Fall wurden sowohl die Strukturen als auch die Oberflächen an den Immobilisierungsprozess angepasst. Im Fall der hier verwendeten Nanoholes lag die besondere Herausforderung in den chemisch ähnlichen Oberflächen, die modifiziert werden mussten, um den Immobilisierungsprozess zu steuern. Es ist aber dennoch gelungen, den Immobilisierungsprozess so weit zu optimieren, dass eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Bindung der Partikel im Nanohole erreicht werden konnte.

Die in diesem Abschnitt vorgestellten kombinierten Monolagen dienten der optimalen Immobilisierung von Biomolekülen am Boden der Nanoholes und einer anschließenden Hybridisierung in den Nanoholes mit nanopartikelmarkierten Biomolekülen. Die Partikel sollten ausschließlich in den Nanoholes immobilisiert werden, weil die Bindung über eine biochemische Erkennungsreaktion stattfindet. Diese Ergebnisse werden im Kapitel 4.4.2 vorgestellt und im Zusammenhang mit den Biochips diskutiert.

### 4.3.2 Optische Eigenschaften von Nanoholes mit Nanopartikeln

Die optischen Eigenschaften von Nanoholes werden durch die Anwesenheit von Nanopartikeln stark beeinflusst. Die dabei auftretenden Änderungen sind abhängig von den Nanopartikeln selbst, sprich deren Größe, Form und Material, aber auch von der Anzahl und Position der Partikel im Loch der kombinierten Struktur. Die Veränderung der optischen Eigenschaften kann auf zwei Wegen charakterisiert werden. Eine Möglichkeit ist die Auswertung spektraler Daten aus den Transmissionsmessungen einzelner Nanoholes oder der Auswertung der Farbwerte aus



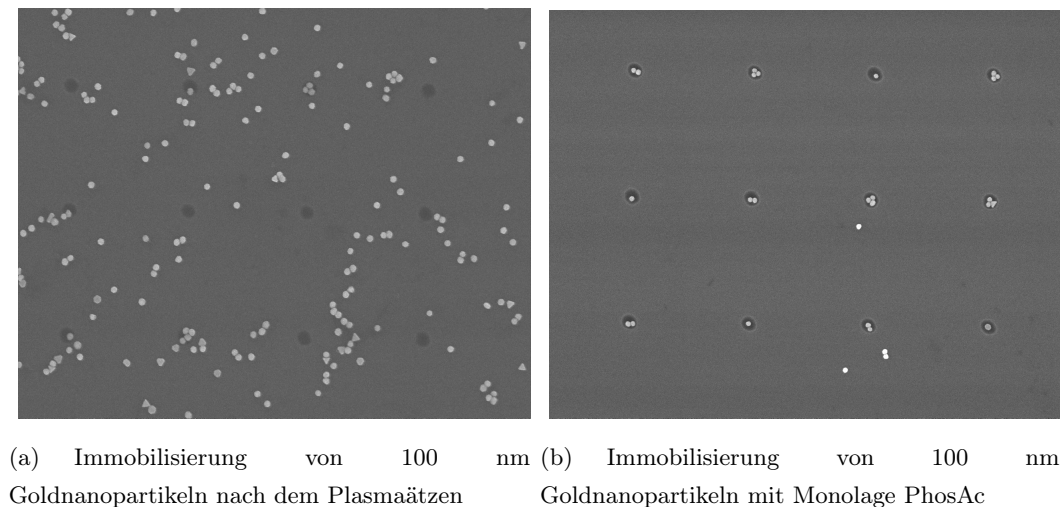


Abb. 4.16: Immobilisierungseffizienz mit Hilfe von PhosAc

Mikroskopiebildern. Bevor die Ergebnisse zu den verschiedenen Parametern, die die optischen Eigenschaften der Hybridnanostruktur beeinflussen, präsentiert werden, soll noch auf die Datenverarbeitung und die Messbedingungen eingegangen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass nur durch eine gezielte Datenverarbeitung mit optimierten Messparametern die optischen Eigenschaften der Hybridnanostruktur sichtbar gemacht werden können.

### Spektrale Charakterisierung durch Mikrospektroskopie

Ein wichtiger Faktor bei der Auswertung der spektralen Daten ist daher die Datenprozessierung.

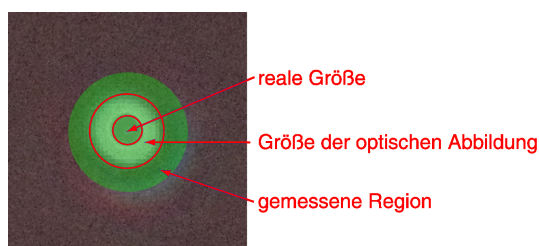


Abb. 4.17: Messregion für Nanoholespektren

Die gemessenen Spektren enthalten einen großen Anteil an Signalen, die auf andere Quellen als Nanoholes zurückzuführen sind. Das liegt unter anderem daran, dass durch den Mikroskopiermodus das Signal mit der Lichtquelle und der Gerätefunktion moduliert wird. Außerdem wird immer ein Anteil aus dem Hintergrund mitgemessen. Dieser Signalanteil bereitet die größten Schwierigkeiten bei der

Auswertung der Spektren.

Die Messung des Spektrums erfolgte über ein Pinhole, das größer war als die eigentliche Abbildung des Nanoholes, so dass nicht nur das Loch gemessen wurde, sondern auch ein Teil der Umgebung. Abb. 4.17 zeigt in der optischen Abbildung zum einen den Streukegel, der wesentlich größer als das eigentliche Nanohole ist. Zum anderen wird deutlich, dass die Messregion auch Teile des Chrms einschließt. Dieses ist zwar ein systematischer Fehler in der Messung, jedoch kann dieser Fehler nicht exakt herausgerechnet werden. Der Grund hierfür liegt in der Geometrie des Nanoholes. Die Größe der optischen Abbildung wird, wie bereits in Abb. 4.8 gezeigt, durch den Durchmesser und die Tiefe des Nanoholes bestimmt. Daraus folgt, dass von einer konstanten Größe der Messregion ausgegangen wird, während sich die Größe der optischen Abbildung in Abhängigkeit von der Nanoholegröße ändert. Somit variiert auch der Anteil des Hintergrundes. Weiterhin beeinflusst auch ein Nanopartikel, der

sich in einem Nanohole befindet, den Anteil des Hintergrundes im Signal. Um die Spektren dennoch vergleichbar auswerten zu können, ist eine einheitliche und sinnvolle Datenprozessierung notwendig.

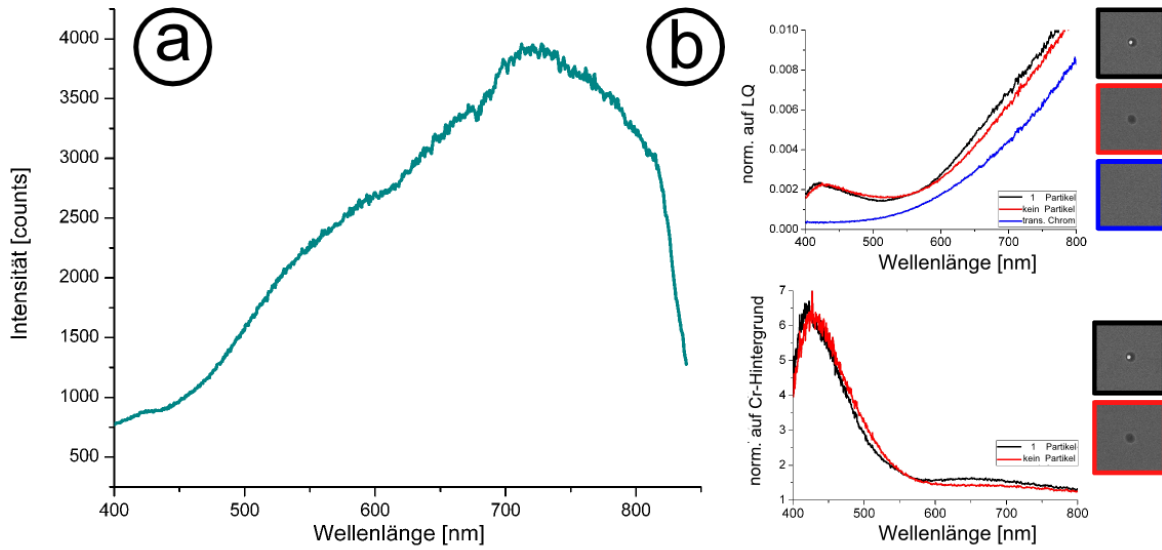


Abb. 4.18: Einfluss der Datenprozessierung (a) unverarbeitetes Spektrum, (b) oben: Spektrum normiert auf die gemessene Lichtquelle; unten: Spektrum normiert auf den Chromhintergrund

Abb. 4.18 (a) zeigt die unverarbeiteten spektralen Daten. Im Beispielspektrum ist keine Charakteristika der Nanoholes erkennbar. Das Spektrum wird hauptsächlich durch die Lichtquelle und die im Mikroskop verwendeten Optiken bestimmt. Die Lichtquelle als Temperaturstrahler mit einer Farbtemperatur von 3200 K bewirkt einen großen Beitrag im roten Bereich des Spektrums (ab 650 nm). Die verwendeten Optiken dämpfen zusätzlich alle Anteile unterhalb von 400 nm. Durch eine Normierung der Daten auf die Lichtquelle, was auch alle gerätetechnischen Einflüsse einschließt, werden die eigentlichen Signalanteile hervorgehoben. Wie in Abb. 4.18 (b) zu sehen ist, tritt dann ein lokales Maximum bei 430 nm auf. Der Kurvenverlauf im Bereich von 470 nm bis 580 nm ändert sich in der Anwesenheit eines Partikels nur geringfügig. Der Verlauf oberhalb einer Wellenlänge von 500 nm wird hauptsächlich durch die zunehmende Transmittivität des Chroms bestimmt, wie anhand der blauen Kurve im Diagramm (Abb. 4.18 (b)) deutlich sichtbar ist. Durch Schwankungen im gemessenen Anteil des Chromhintergrundes werden auch die prozessierten Spektren beeinflusst. Dadurch wird es schwer, Veränderungen, die durch Nanopartikel im Nanohole hervorgerufen werden, eindeutig zu erkennen und zu klassifizieren.

Eine Normierung auf den Chromhintergrund macht allerdings die einzelnen Signalanteile deutlich. Das Spektrum wird dabei von den rein optischen Eigenschaften des Nanoholes losgelöst, da es sich hierbei um eine relative Größe handelt, die beschreibt, wieviel mehr Licht ein Nanohole bei einer bestimmten Wellenlänge transmittiert. Dennoch können in diesen Spektren (Abb. 4.18 (b) unten) den einzelnen Wellenlängenbereichen die physikalischen Ursachen zugeordnet werden. So ist das erste Maximum bei ca. 430 nm auf die beugungsbegrenzte Transmission des Nanoholes selber zurückzuführen. Diese ändert sich, wie schon in Abb. 4.9 gezeigt, mit den geometrischen Eigenschaften des Nanoholes. Der Einfluss der Nanopartikel zeigt sich in einem zusätzlichen Minimum bei ca. 530 nm. Das steht wiederum sehr gut im Einklang mit der Absorption von Goldnanopartikeln, die bei vergleichbaren Wellenlängen liegt. Um dieses Verhalten mit den theoretischen Betrachtungen der Plasmonik zu überprüfen, sind verschiedene

Simulationen erstellt wurden<sup>3</sup>, die das Verhalten eines Nanoholes mit und ohne Nanopartikel in der Mitte des Lochs berechnen. Die berechneten Werte wurden dann über eine Kugelteilfläche integriert, um ein Spektrum zu erhalten. Die Größe dieser Fläche wurde so gewählt, dass sie der Messung eines Objektives mit einer  $NA = 0,9$  entspricht. Daraus resultiert ein Spektrum, welches den realen Begebenheiten sehr nahe kommt. Dennoch gibt es einige wichtige Unterschiede. So wird eine gleichförmige Lichtquelle angenommen, bei der die Intensität für alle Wellenlängen gleich ist. Weiterhin wird der Chromhintergrund nicht wie im Falle des real vorhandenen Pinholes mit in das Spektrum integriert. Daraus resultiert ein Spektrum, das die physikalischen Parameter sehr gut abbildet und sich sehr gut mit den realen Messungen vergleichen lässt. Die Darstellungen im linken Teil der

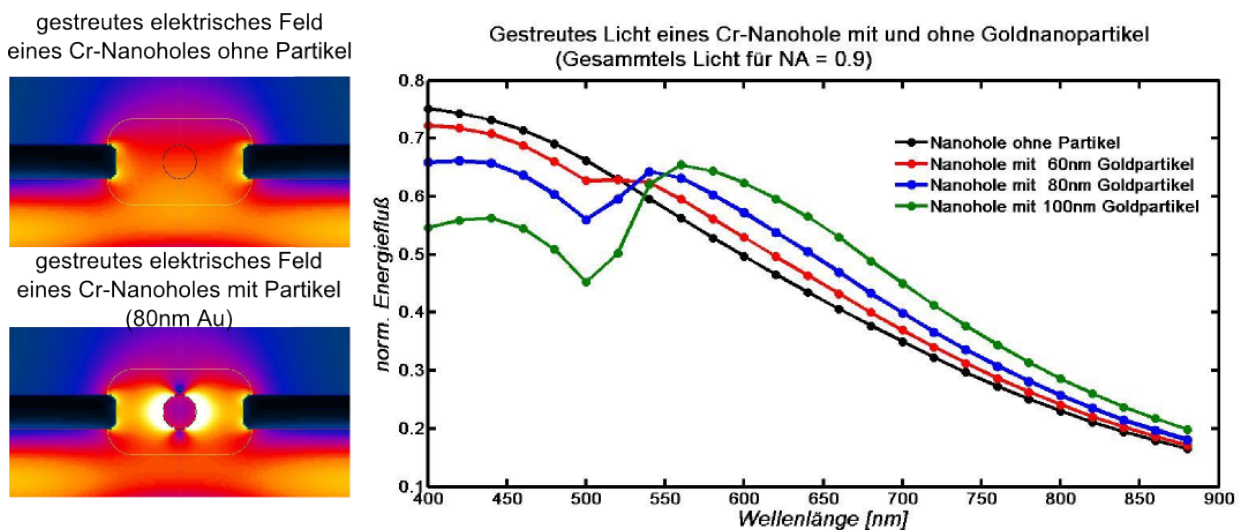


Abb. 4.19: Simulierter Energiefluss für ein Cr-Nanohole mit und ohne Nanopartikel (links) und simulierte Spektren (rechts)

Abb. 4.19 zeigen, wie sich der Energiefluss durch das Vorhandensein eines Nanopartikels im Nanohole bei Resonanz des Nanopartikels (530 nm) ändert. Dabei wird deutlich, wie stark das einfallende Licht durch den Partikel beeinflusst wird. Auch die Spektren auf der rechten Seite zeigen, wie sich das Spektrum durch die Anwesenheit der Nanopartikel verändert. Der markanteste Einfluss ist das lokale Minimum bei der Resonanzwellenlänge des Partikels. Dieses lokale Minimum lässt sich am besten durch die Absorption des Nanopartikels erklären, während bei etwas höheren Wellenlängen eine Erhöhung der Intensität festzustellen ist, die durch die Streuung des Nanopartikels entsteht. Der Nanopartikel wirkt dabei als Lichtkoppler im Nanohole, der das Licht durch das Loch „transportiert“. Dieses Verhalten ist real zu beobachten, auch wenn hier bedingt durch den Messaufbau einige Unterschiede auftreten. So wird durch das verwendete Pinhole und die genutzte Lichtquelle ein zusätzlicher Anteil ins Signal integriert, wie schon in Abb. 4.18 zu sehen ist. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Pinholegröße auf das entstehende Signal untersucht.

Dazu wurde in dieser Arbeit dasselbe Nanohole mit drei verschiedenen **Pinholegrößen** (75  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$  sowie 150  $\mu\text{m}$ ) vermessen. Das Licht, das durch das Pinhole gesammelt wird, wird im Spektrometer integriert, wodurch der Signalanteil des Hintergrundes mit der Größe des Pinholes skaliert. Mit Verkleinerung des Pinholes wird auch der Anteil des Hintergrunds kleiner und die Signale nähern sich der zu erwartenden Signalform an, wie in Abb. 4.20 zu sehen ist. Wie aus den oben

<sup>3</sup>Die Simulationen wurden von Dr. Ondrej Stranik mittels der Software OpenMax erstellt.

gezeigten numerischen Berechnungen ersichtlich ist, erzeugt ein Nanopartikel in einem Nanohole einen Dip im Bereich um 540 nm. Nach dem Dip fällt das Signal wieder ab. Die Größe der Messregion auf dem Substrat skaliert mit dem verwendeten Objektiv. Hier wurde ein 100×Objektiv verwendet, so dass der Durchmesser der tatsächlichen Messregionen je nach verwendeten Pinhole 750 nm, 1  $\mu\text{m}$  oder 1,5  $\mu\text{m}$  beträgt. Im Nanohole befindet sich ein Nanopartikel, was am deutlichen Minimum in Abb. 4.20 erkennbar ist. Die Signalqualität erhöht sich mit der Verkleinerung des Pinholes. Dadurch wird gerade der Einfluss des Nanopartikels deutlicher. Mit kleinen Pinholes wird der Anteil des Hintergrunds bei der Normierung besser unterdrückt und der Signalanteil des Partikels wird deutlicher. Allerdings hat die Verwendung sehr kleiner Pinholes auch Nachteile für die Messungen. So kommen Pinholes mit einer Größe von 50  $\mu\text{m}$  in den Bereich der beugungsbegrenzten Auflösung des Mikroskops. Damit ist die Transmission nicht mehr unabhängig von der Wellenlänge. Außerdem wirkt die verwendete Anordnung aus Nanohole und Pinhole intrinsisch wie eine konfokale mikroskopische Messung. Dabei ist das Nanohole eine Punktquelle, die auf einem punktförmigen Detektor abgebildet wird. Eine Konsequenz einer solchen Anordnung ist, dass Signale außerhalb der Fokusebene ausgeblendet werden. Je kleiner die verwendeten Pinholes sind, desto mehr Licht wird ausgeblendet. In der Praxis bedeutet dies aber, dass sich kleine Ungenauigkeiten in der Fokussierung extrem stark auf das Messsignal auswirken. Diese Messungenauigkeiten äußern sich vor allem in der Intensität, können aber auch Verschiebungen in den resultierenden Spektren bewirken. Große Pinholes besitzen einen größeren Hintergrundanteil und dadurch verschwindet bei der Normierung ein Teil des Signals. Dieses wiederum erschwert so die Auswertung der gemessenen Signale. Deswegen ist die Verwendung von Pinholes mit einer Größe von 100  $\mu\text{m}$  optimal für die spektrale Messung einzelner Nanoholes.

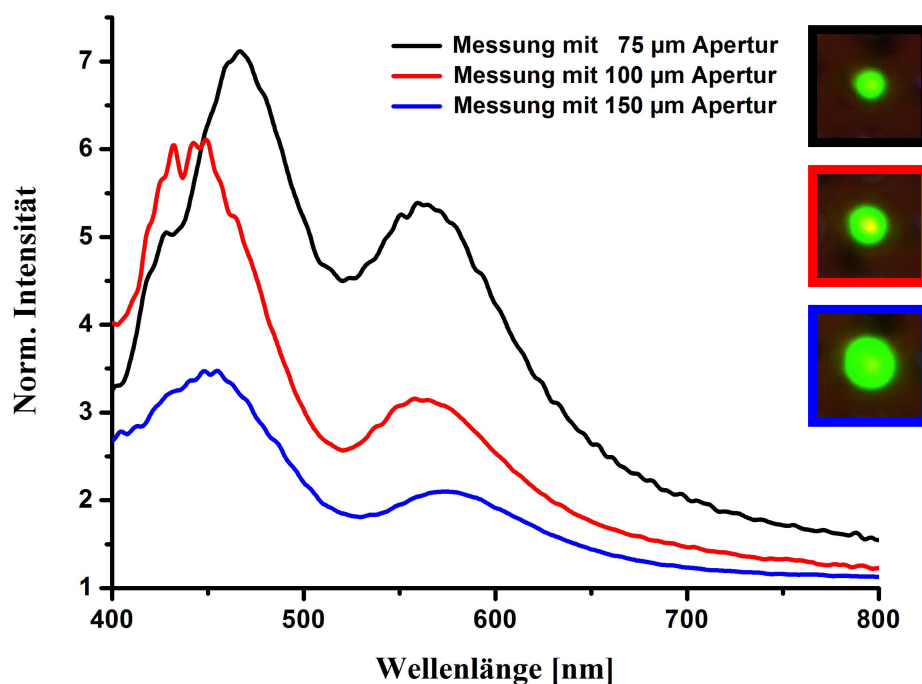


Abb. 4.20: Einfluss der Pinholegröße auf das Spektrum eines Nanoholes mit Nanopartikeln  
( $\varnothing 80$  nm, alle Messungen stammen vom selben Nanohole)

Die bisher beschriebenen Einflüsse sind durch die Messanordnung selbst bedingt und beschreiben daher nicht die eigentliche Hybridnanostruktur. Da aber für diese Struktur keine Messanordnung vorlag und auch nicht auf bereits geprüfte Messverfahren zurückgegriffen werden konnte, war eine umfangreiche Charakterisierung der optischen Eigenschaften notwendig. Die Ergebnisse werden vielmehr für die Interpretation der im nächsten Teil beschriebenen Daten benötigt. Die Veränderungen im spektralen Verhalten der Nanoholes durch Nanopartikel lassen sich in erster Linie auf die Parameter der Nanopartikel zurückführen. Diese Parameter umfassen Größe, Material, Form und Materialkomposition (vergleiche Kap. 4.1). Des Weiteren muss auch die Anzahl der Partikel im Loch als ein zusätzlicher Faktor betrachtet werden.

### **Einfluss der Größe der Nanopartikel**

Um den Einfluss der Nanopartikelgröße auf die spektralen Eigenschaften zu untersuchen, wurden Nanopartikel unterschiedlicher Größe (60 nm, 80 nm, 100 nm) in den Nanoholes immobilisiert. Anschließend wurden Löcher mit einem Partikel mit Hilfe von REM-Aufnahmen selektiert und spektral untersucht. Da sich die einzelnen gemessenen Spektren deutlich voneinander unterschieden, wurde ein Merkmal zur Klassifikation der Spektren ausgewählt. Dieses Merkmal war die Wellenlänge des lokalen Minimums (Dip) im Bereich zwischen 500 nm und 700 nm. Numerische Simulationen (Abb. 4.19) und spektrale Messungen zeigten, dass dieses Minimum nur bei Anwesenheit eines Partikels auftritt und sich in Abhängigkeit von der Partikelgröße verschiebt. Die Detektion des Minimums ist nur als lokales Minimum im Polynomfit möglich. Verschiebt sich das Minimum zu sehr in den Bereich kleiner Wellenlängen, wird es durch den Transmissionspeak des Lochs überdeckt und ist als Schulter im Spektrum erkennbar, die nicht mehr durch den verwendeten Algorithmus erkannt werden kann. Diese Schulter tritt vor allem bei Nanopartikeln mit einer Größe von 60 nm auf (Abb. 4.21 grüne Kurve). Die Minima für Nanoholes mit größeren Partikeln liegen spektral weit genug vom ersten Peak entfernt und lassen sich somit sehr gut auswerten. Die statistische Auswertung macht allerdings deutlich, dass der spektrale Unterschied zwischen Partikeln mit 80 nm und 100 nm nicht signifikant ist. Daher kann das Spektrum nicht als alleiniges Unterscheidungsmerkmal für diese Partikelgrößen herangezogen werden. Bei genauer Betrachtung der Werteverteilung der Minima wird deutlich, dass die Partikel mit 80 nm Durchmesser eine schmalere Verteilung haben als die 100 nm großen Partikel. Diese weisen eine sehr breite Verteilung auf. Beim Vergleich dieses Effekts mit den Breiten der Größenverteilungen der Nanopartikel (vgl. Kap. 4.1 Abb. 4.3(b)) wird klar, dass durch die Spektren die reale Größenverteilung der Nanopartikel abgebildet wird. Bei Verwendung von Nanopartikeln mit einer schmaleren Größenverteilung ließen sich die Größen sehr gut mit Hilfe der spektralen Minima ermitteln. Anhand der Spektren ist weiterhin erkennbar, dass die Intensität des Signals mit der Größe zunimmt. Allerdings kann dieser Effekt nicht exakt quantifiziert werden, da dieser auch von anderen Größen wie Lochtiefe und Position des Partikels im Loch beeinflusst wird.

Für die Verwendung als Biosensor eignen sich daher die Partikel mit einem Durchmesser von 100 nm am besten. Diese Partikel besitzen ein hohes Signal und ein sehr gut detektierbares Minimum, welches sich sehr gut mit Hilfe eines automatischen Algorithmuses auswerten lässt. Für die biosensorische Anwendung ist die Verschiebung der Minima der wichtigste Messwert, deswegen ist ein starkes Signal mit einem ausgeprägten Dip von Vorteil, da er durch die Software automatisch erkannt werden kann. Die 100 nm großen Partikel liefern das am besten zu detektierende Signal (siehe Kap. 4.4.1). Die gemessenen Signale entsprechen in der Qualität auch den bisher oft genutzten LSPR-Sensoren aus einzelnen Partikeln<sup>[121,122]</sup> mit dem Vorteil, dass die verwendete optische Detektion im Aufbau einfacher ist, da auf eine Dunkelfeldanordnung verzichtet werden kann.

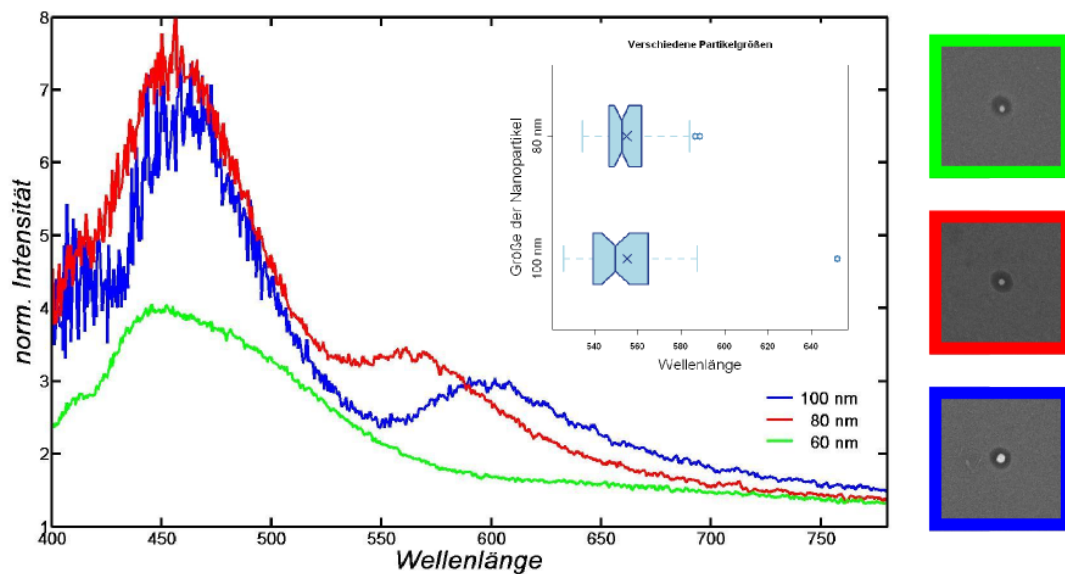


Abb. 4.21: Spektrale Verteilung bei verschiedenen Partikelgrößen

### Einfluss des Materials der Nanopartikel

Einen weiteren Einfluss auf die spektralen Eigenschaften von Hybridnanostrukturen hat das Partikelmaterial. Durch Änderung des Materials zum Beispiel von Gold zu Silber verschiebt sich die Plasmonenresonanz der Partikel in Richtung kleinerer Wellenlängen. Diese Verschiebung macht sich auch in den Spektren der Nanoholes bemerkbar, wenn diese mit Silbernanopartikeln kombiniert werden. In Abb. 4.22 wird das Vorhandensein eines Nanopartikels (hier  $d = 100$  nm) anhand der Schulter im Spektrum deutlich. Die Ausprägung dieser Schulter hängt von der Größe der Nanopartikel und von der Größe des umgebenden Loches ab. Da die Silberpartikel in der Regel in ihrer Größenverteilung sehr inhomogen sind, lassen sich nur schlecht Aussagen bezüglich Größe und Anzahl der Partikel im Loch ableiten. Das vermutete Minimum bei diesen Messungen liegt zwischen 480 nm und 540 nm und deutet damit auf sehr große Partikel oder Konglomerate hin. Mit definiert großen Silberpartikeln ließen sich die Aussagen bezüglich der Minima deutlich verfeinern und eine Abschätzung der Anzahl und Größe der Partikel wäre möglich. Dennoch kommen Silbernanopartikel aufgrund ihrer stärkeren Plasmonenresonanz als Sensorelement in Frage.

Als weitere Variante der Materialänderung kommt die Herstellung bimetallischer Core-Shell-Nanopartikel in Frage. Dabei wird auf dem bereits immobilisierten Goldnanopartikeln chemisch eine dünne Schicht Silber abgeschieden, wodurch eine Hybridnanostruktur mit neuen Eigenschaften entsteht. Ein Vorteil dieser Variante besteht in der erhöhten Sensitivität des Sensorelements gegenüber dem lokalen Brechungsindex und einer Verschiebung des Dips zu kleineren Wellenlängen. Wie aus Abb. 4.23 hervorgeht, verschiebt sich der Dip mit Aufbringen einer Silberschicht in Richtung kleinerer Wellenlängen zu 550 nm. Da in dieser Abbildung nur die absoluten Werte abgebildet sind, ist der Effekt der Verschiebung nicht deutlich zu erkennen. Abb. 4.23 zeigt die spektralen Ergebnisse unter Verwendung von 80 nm großen Partikeln, was aufgrund der an sich schon breiten Verteilung sowie der großen Partikelgröße zu einer sehr breiten Statistik führt. Die tatsächliche Verschiebung ist anhand von Abb. 4.24 besser zu erkennen. In diesem Diagramm ist die Verschiebung ausgehend vom Ursprungswert nach jedem einzelnen Schritt der Silberverstärkung



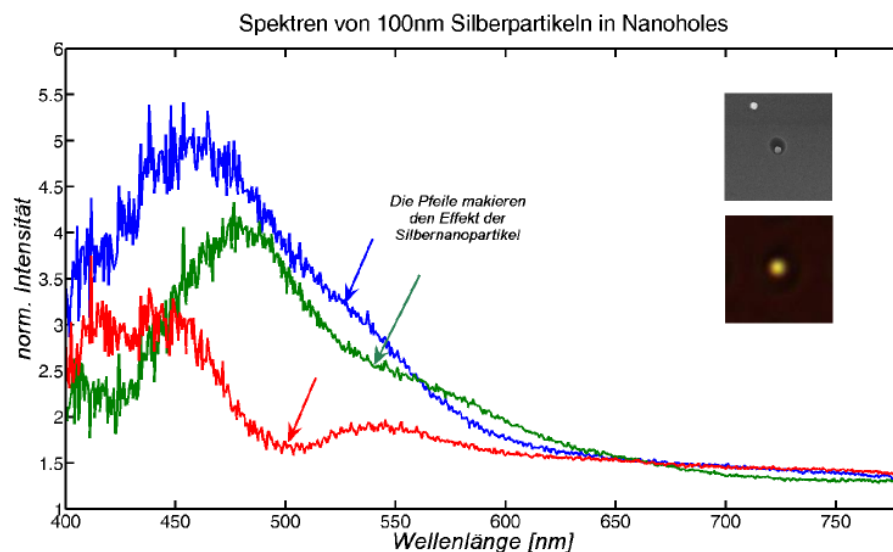


Abb. 4.22: Spektrale Eigenschaften der Hybridnanostrukturen bei Verwendung von Silberpartikeln (vgl. Minima der Goldnanopartikel in Nanoholes Abb. 4.21)

aufgetragen. Die in Abb. 4.24 angegebenen Abschätzungen für die Hüllendicken von 10 nm für 15s Silberverstärkung und 20 nm für 30s Silberverstärkung beruhen auf einer empirischen Abschätzung der Reaktionskinetik nach Festag.<sup>[123]</sup> Im ersten Schritt ist eine signifikante Blauverschiebung um ca. 3 nm mit geringer statistischer Streuung der Dip-Wellenlängen erkennbar. Mit dem zweiten Schritt entstand eine zusätzliche Verschiebung um ca. 12 nm vom Ausgangswert. Die Zunahme der Streuung der spektralen Daten liegt wahrscheinlich daran, dass mehrere Partikel in einem Loch durch die Silberabscheidung zu einem großen Partikel zusammen gewachsen sein könnten. Dennoch zeigte sich in jeder Stufe eine deutliche Veränderung der spektralen Eigenschaften, was mit neuen Sensoreigenschaften für die Bioanalytik einhergeht.

Ein weiterer Vorteil der Silberverstärkung ist als Nebeneffekt die zusätzliche Befestigung der immobilisierten Nanopartikel am Substrat. Gegenüber verschiedenen Waschschritten war hier eine hohe Stabilität zu verzeichnen, so dass nur eine geringe Anzahl von Partikeln verloren ging. Dieser Umstand ist für die spätere Verwendung der Hybridnanostruktur als Biosensor hilfreich, da zur Anbindung der Moleküle die Substrate in mehreren Prozessschritten gereinigt werden.

### Anzahl der Nanopartikel im Nanohole

Eine wichtige Methode, um das Spektrum der Hybridnanostruktur gezielt zu verändern, ist die Variation der Partikelanzahl pro Loch. Durch die Immobilisierung mehrerer Partikel pro Loch entsteht eine plasmonische Kopplung der Partikel, welche die optischen Eigenschaften der Hybridnanostruktur verändern. Die Anzahl der Partikel im Loch bestimmt einerseits die Intensität des transmittierten Lichts der Löcher. Andererseits wird dadurch auch die Wellenlänge des Dips verschoben. Mit zunehmender Partikelanzahl in den Löchern wird der Dip in Richtung Rot verschoben. Allerdings sinkt auch die Transmission mit steigender Anzahl an Partikeln. Für eine Partikelgröße von 100 nm liegt die Grenze der messbaren Transmission bei etwa 5 Nanopartikeln. Ab dieser Partikelanzahl nimmt die Transmission durch das Nanohole in Abhängigkeit von der Größe der Partikel stark ab. In Abb. 4.25 sind auf der linken Seite die Spektren von Löchern mit unterschiedlicher Partikelanzahl dargestellt. Die Farben der Spektren entsprechen den Farben der Kästen in der Mitte der Abbildung.

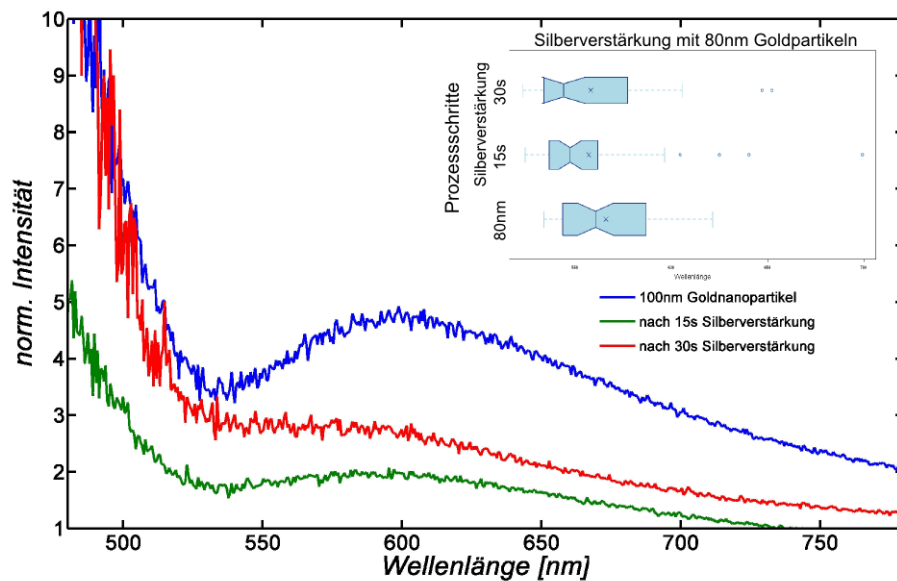


Abb. 4.23: Einfluss der Silberverstärkung auf das Spektrum der Hybridnanostruktur (vgl. mit Minima von Silberpartikeln Abb. 4.22)

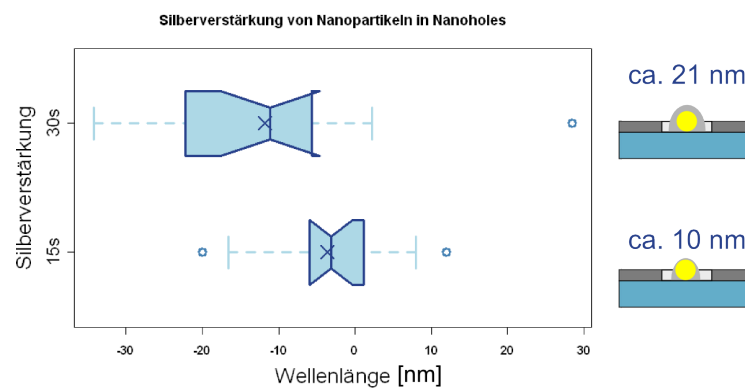


Abb. 4.24: Spektrale Verschiebung durch Silberverstärkung

Die Abbildung macht noch einmal deutlich, dass durch die Anzahl der Partikel die Wellenlängen des Dips in Richtung Rot verschoben werden. Bei Betrachtung der Statistik der einzelnen Verteilungen zeigt sich, dass die Dip-Werte zwar eine breite Verteilung haben, aber sich dennoch in einzelne Klassen unterscheiden lassen. Die Kerben in den Boxplots überlagern sich bei den einzelnen Klassen nicht, was ein starkes Indiz für einen signifikanten Unterschied der Klassen ist. Für den hier dargestellten Datensatz war die Häufigkeit für Löcher mit einem Partikel beziehungsweise mit mehr als 4 Partikeln sehr gering. Um dennoch statistisch relevante Aussagen zu erhalten, wurden diese Lochtypen<sup>4</sup> mit anderen Klassen zusammengelegt. Da sowohl die Anordnung der Partikel im Nanohole als auch deren Größe das Spektrum beeinflussen, werden die einzelnen Klassen im Boxplot verbreitert, was dazu führt, dass die Messunsicherheit in Bezug auf die Partikelanzahl zunimmt. Dennoch lassen sich die einzelnen Lochtypen sehr gut spektral und statistisch signifikant

<sup>4</sup>Bezieht sich hier auf die Anzahl der Partikel im Loch.



voneinander unterscheiden. Diese Ergebnisse wurden zwar erwartet, aber im Rahmen dieser Arbeit konnten die Einflussfaktoren erstmals quantifiziert und statistisch für die Hybridnanostruktur belegt werden. Die Untersuchungen der verschiedenen Parameter zeigen, wie durch die Änderung einzelner Parameterwerte wie Größe, Material oder Anzahl unterschiedliche optische Eigenschaften entstehen, die dann für die bioanalytische Applikation genutzt werden können. Es wird in dieser Arbeit aber auch deutlich, dass es notwendig ist, zwischen einer hohen Sensitivität und einer optisch stabil und gut auslesbaren Nanostruktur abzuwägen.

Diese Daten liefern ein detailliertes Bild der optischen Eigenschaften aufgrund der hohen spektralen Auflösung des Spektrometers. Nachteilig ist jedoch, dass durch die serielle Aufnahme der Daten ein hoher Zeitaufwand erforderlich ist und eine geringere Anzahl von Nanoholes gemessen werden kann. Alternativ kann die Bildverarbeitung zur Charakterisierung herangezogen werden, da hiermit gleichzeitig eine große Anzahl von Nanoholes mit ihren optischen Eigenschaften charakterisiert werden kann. Dabei wird auf die Farbwerte der Kamera zurückgegriffen, die ein gewichtetes Dreikanalspektrum darstellen und sich sehr gut zur Klassifizierung von Bildobjekten eignen. Der Nachteil dieser Methode besteht allerdings in der geringeren spektralen Auflösung.

### Charakterisierung durch Farbwerte und Bildverarbeitung

Zur optischen Charakterisierung der Hybridnanostrukturen können auch die Bilddaten von Mikroskopaufnahmen herangezogen werden. Dabei nimmt die Kamera des Mikroskops ein RGB-Farbbild auf, welches im Anschluss spektral ausgewertet wird. Ein Farbbild liefert prinzipiell vier Werte, mit denen sich die spektrale Verteilung der einzelnen Bildpunkte beschreiben lässt. Das sind im Einzelnen die Farbkanäle Rot (R), Grün (G) und Blau (B) sowie die Helligkeit (Y). Diese Werte stellen die grundsätzliche Spektralverteilung dar, wie sie auch mit der Optik unserer Augen gesehen wird. Die spektrale Auflösung ist dabei nicht besonders hoch, dennoch lassen sich allein durch das RGB-System über 32 Millionen Farben darstellen, weshalb sich die Verwendung dieser Farbwerte zur schnellen und parallelen Auswertung von optischen Messdaten gut eignet. Die gewünschten Objekte können über Algorithmen zur Objekterkennung und Trennung separiert und einzelne Pixel den Objekten zugeordnet werden (Abb. 4.26). Nach der Objekterkennung können jedem Objekt, das heißt jedem Nanohole, die charakteristischen Werte zugeordnet werden, wobei es verschiedene Varianten der Farbwertdarstellung gibt. Eine Möglichkeit ist die Darstellung über

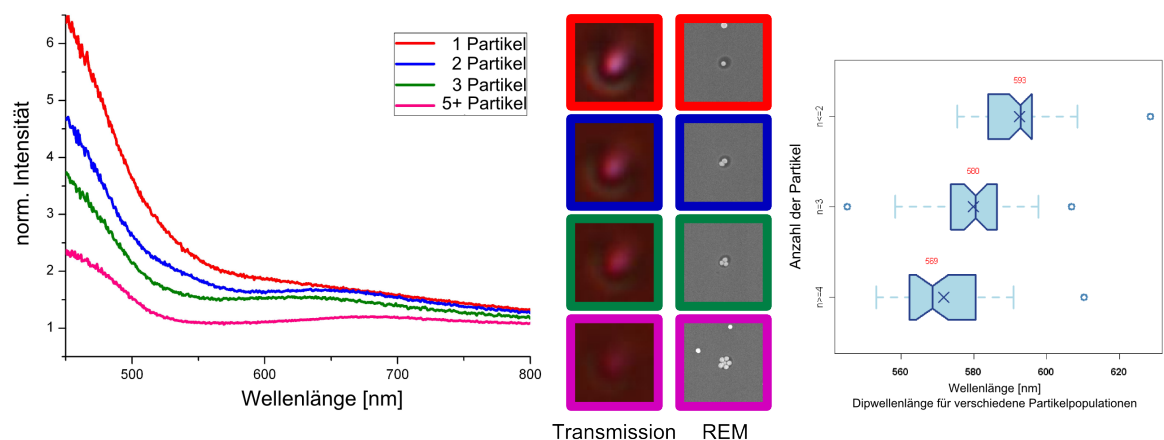


Abb. 4.25: Variation der Nanopartikelanzahl im Loch

einen charakteristischen Wert, der die Eigenschaften des Nanoholes berücksichtigt. Dieser Wert ist der relative Rotanteil ( $R_{rel}$ ) oder der gewichtete relative Rotanteil ( $R_{w,rel}$ ). Die Definition dieser Werte ist willkürlich und basiert auf der Beobachtung, dass Nanoholes nach der Immobilisierung mit Nanopartikeln in Transmission rot erscheinen. Die rote Farbe der gefüllten Nanoholes liegt auch in Übereinstimmung mit der spektralen Datenauswertung, da das Minimum im grünen Bereich des Spektrums liegt und somit der rote Spektralbereich verstärkt hervortritt. Die Farbwerte können auch über die Vier-Quadranten-Darstellung ausgewertet werden. Dabei wird jedem Objekt ein x- und ein y-Wert in einem Koordinatensystem mit vier Quadranten zugeordnet (siehe Kap. 3.6.2). Der Vorteil dieser Darstellung liegt in der räumlichen Trennung der Daten entsprechend des Anteils der einzelnen Signale. Damit lassen sich einzelne Gruppen von Daten sehr gut lokalisieren und mit Hilfe einer Clusteranalyse automatisch in bestimmte Kategorien einordnen. Das ist wiederum notwendig, um die Daten vollkommen automatisiert auswerten zu können. Wie oben beschrieben, erscheinen Nanoholes

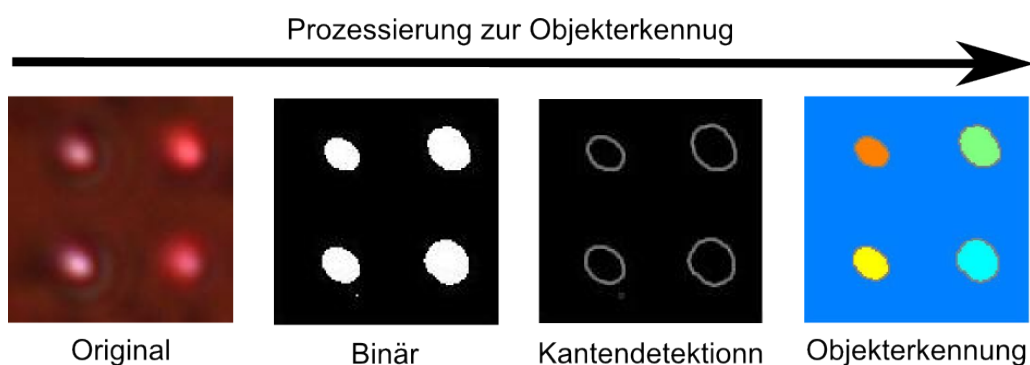
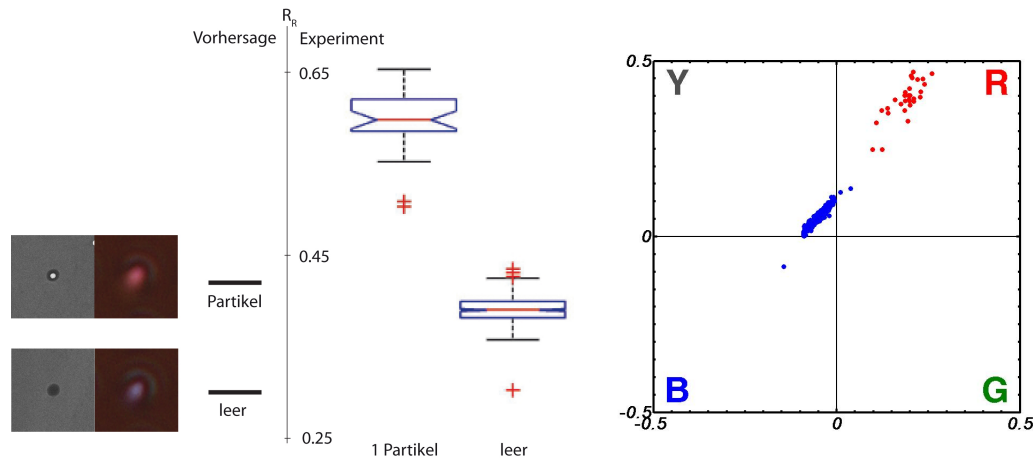


Abb. 4.26: Prozessschritte zur Objekterkennung mittels Watershed-Transformation

mit Nanopartikeln in den mikroskopischen Bildern rötlicher als Nanoholes ohne Nanopartikel. Um dieses Verhalten zu bestätigen, wurde auf die schon zuvor erwähnten Simulationen zurückgegriffen. Mit Hilfe der aus den Simulation gewonnenen Spektren können die zu erwartenden RGB-Werte errechnet und können die gemessenen Farbwerte mit der theoretischen Simulation verglichen werden. In Abb. 4.27(a) links sind die aus einer Simulation berechneten Werte abgebildet. Es ist deutlich zu sehen, dass sich diese von den realen Werten unterscheiden, obwohl der Trend klar abgebildet wird. Das bedeutet, dass simulierte Löcher mit einem Nanopartikel einen höheren Wert für  $R_{rel}$  als Löcher ohne Partikel haben. Die großen Unterschiede zwischen realen und vorhergesagten Werten basieren einerseits auf den Vereinfachungen in der Simulation und andererseits in der Schwierigkeit, die Farbwerte für die konkrete Situation exakt zu bestimmen, wie zum Beispiel die Adaption auf die Beleuchtungssituation. Bei Betrachtung der realen Werte für leere und gefüllte Nanoholes ist dennoch eine klare Trennung zwischen beiden Nanoholetypen erkennbar. Die Darstellung in der Vier-Quadrantenmatrix ergibt ein ähnliches Bild. Wie aus Abb. 4.27(b) ersichtlich, ist diese klare Trennung aufgrund des erhöhten Rotanteils in den Abbildungen der Nanoholes möglich. Die durchgeführte Klassifizierung mittels k-means-Algorithmus lieferte genau zwei Klassen, eine mit Partikeln und eine ohne Partikel. Die mit diesem Algorithmus durchgeführte Klassifizierung funktioniert sehr gut, weil hier eine optimale Trennung der Daten vorherrscht und sich somit auch keine Fehlzugeordnungen ergeben. Um mehr als zwei Partikelpopulationen zu erkennen, müssen die vorhandenen Werte in mehr als eine Klasse eingeordnet werden. Die Schwierigkeit besteht allerdings darin, dass sich die Werte für den Rotanteil nicht mehr so deutlich voneinander unterscheiden. In Abb. 4.28 ist links das mikroskopische Bild der Nanoholes dargestellt, bei dem die einzelnen



(a) Experimentelle und theoretische Werte aus der Bildverarbeitung (b) Einzelne Werte der Nanoholes, dargestellt im Quadplot

Abb. 4.27: Werte aus der Bildverarbeitung von Nanoholes mit einem Partikel

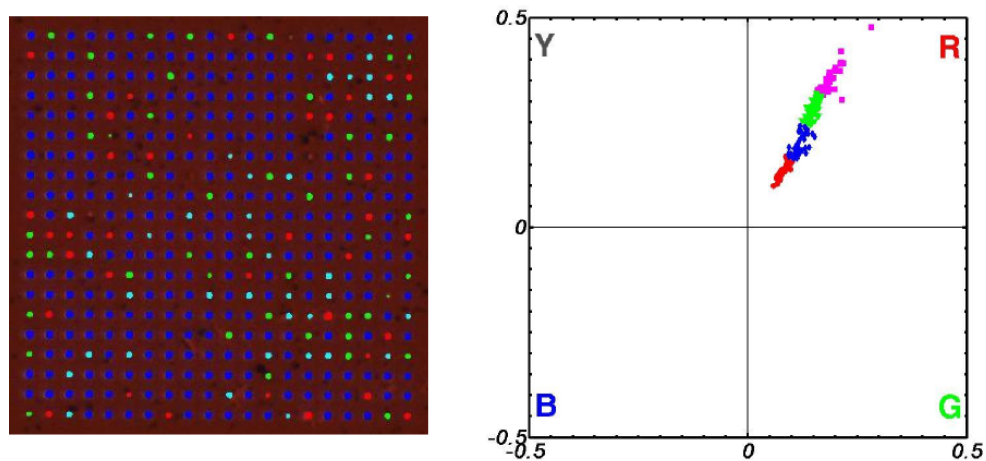


Abb. 4.28: Objekterkennung und Klassifizierung von Nanoholes mit Nanopartikeln

Nanoholes nach ihrer jeweiligen Klassenzugehörigkeit eingefärbt sind. Diese Klassifizierung basierte ebenfalls auf dem k-means-Algorithmus. Das heißt, es werden die Werte der einzelnen Löcher jeweils in vorgegebene Klassen eingeordnet. Für diesen Fall wurden vier Klassen gewählt, da diese Anzahl an Partikelpopulationen anhand der REM-Aufnahmen unterschieden werden konnten. Im rechten Bild (Abb. 4.28) sind die Werte für die Klassifizierung im Vier-Quadrantendiagramm aufgetragen und die einzelnen Klassen markiert. Es ist eine Trennung der Klassen in verschiedene Cluster erkennbar, wobei diese jedoch sehr eng beieinander liegen. Da der k-means-Algorithmus immer alle Werte in eine der vorhandenen Klassen einordnet, lassen sich anhand dieses Bildes zusätzliche Aussagen über die Fehlerquote treffen. Werden wie in Abb. 4.29 die tatsächliche Anzahl von Partikeln (Werte aus REM-Bildern) verwendet und in einem Diagramm zwischen  $R_{rel}$  und  $R_{w,rel}$  aufgetragen, so ist zu sehen, dass sich die Werte für die einzelnen Populationen überlagern können. Die Farbe der Punkte zeigt dabei die tatsächliche Partikelanzahl im Loch. Weiterhin wird auch der Unterschied zwischen den beiden Werten deutlich, was anhand der Verteilung der Werte entlang der y-Achse zu

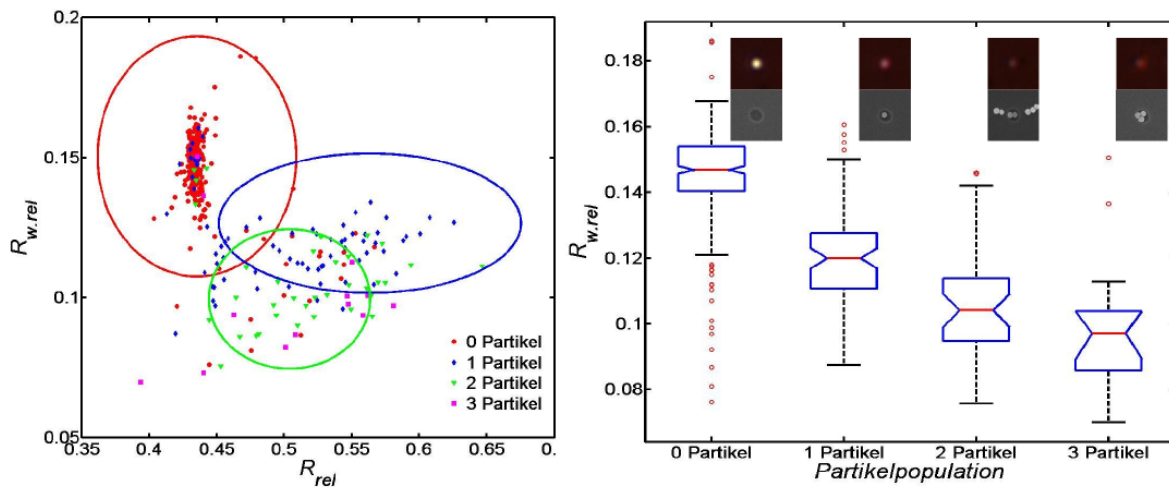


Abb. 4.29: Statistik über die Transmissionseigenschaften der Nanoholes in Abhängigkeit der Nanopartikelanzahl anhand von  $R_{rel}$  und  $R_{w,rel}$

Klasse / Partikelanzahl	0	1	2	3
0 (rot)	0,985	0,004	0,000	0,011
1 (blau)	0,069	0,444	0,194	0,292
2 (grün)	0,056	0,278	0,500	0,167
3 (magenta)	0,000	0,214	0,357	0,429

Tab. 4.2: Trefferquote beim Einordnen in die „richtigen“ Klassen

erkennen ist. Diese Werte werden aufgrund der Wichtung stärker separiert, während sich die Werte in x-Richtung stärker überlagern. Die eingezeichneten Kreise stellen dabei den Bereich eines Clusters dar, der von einem k-means-Algorithmus mit drei Klassen erkannt wird. Zusätzlich ist die Überlagerung der einzelnen Klassen dargestellt. Bei Betrachtung der statistischen Verteilung der Werte über die einzelnen Populationen (Abb. 4.29 rechts) wird klar, dass sich zwar 0, 1 und 2 Partikel signifikant voneinander unterscheiden, aber es aufgrund von Wertüberschneidungen zu Klassifizierungsfehlern kommen muss. Die Quote, mit der Nanoholes mit dem k-means-Algorithmus den richtigen Kategorien zugeordnet werden, ist in Tab. 4.2 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass Nanoholes ohne Partikel mit einer sehr geringen Fehlerquote zu 98,5% erkannt werden. Bei den anderen Klassen werden allerdings nur maximal 50% richtig erkannt. Das liegt vor allem an der starken Überlagerung der Werte, die wiederum hauptsächlich durch die Größenverteilung der Partikel bedingt ist. Wird die Verteilung der Partikelgrößen schmäler, so würde sich die Genauigkeit der Klassifizierung erhöhen. Aus den dargestellten Messwerten wird deutlich, dass eine nahezu fehlerfreie Abgrenzung zwischen leeren und mit Partikeln befüllten Löchern möglich ist. Somit können die aus der Bildverarbeitung gewonnenen Daten sehr gut in der Bioanalytik zur Detektion von Ja-/Nein-Signalen eingesetzt werden.

Andere Arbeiten<sup>[124]</sup> nutzen ähnliche Varianten zur Bestimmung von Änderungen an plasmonischen Nanostrukturen anhand von Bilddaten. Die Basis ist dabei das Verhältnis zwischen rotem und dem grünen Kanal der Kamera. Dabei können Veränderungen an einem Nanopartikel bis zu einer Resonanzverschiebung von 5 nm detektiert werden. Im Unterschied zu der in dieser Arbeit entwickelten

Datenverarbeitung wird bei Ungureanu<sup>[125]</sup> eine Kalibrierung mittels eines Spektrometers benötigt, welche durch die hier entwickelte Datenverarbeitung entfällt. Das hier verwendete Verfahren ist speziell auf die Anforderungen der Hybridnanostruktur ausgelegt. Es ist sehr robust bei der Messung der Werte und benötigt keine externe Kalibrierung. Weiterhin liefert es sehr gute Ergebnisse, die sich auch mit den theoretischen Simulationen vergleichen lassen. Außerdem ist es damit sogar möglich, die Anzahl der Partikel pro Loch zu ermitteln. Und das macht diese Methode der Datengewinnung zu einer Möglichkeit wenn die Nanopartikel als Marker in der Hybridnanostruktur eingesetzt werden.

## 4.4 Nachweis von Molekülen in der Hybridnanostruktur

Ein wichtiger Aspekt bei der Untersuchung der Hybridnanostruktur ist, deren mögliches Potential und die Anwendbarkeit in der Bioanalytik zu prüfen. Dabei gibt es zwei grundsätzliche Ansätze. Zum einen können die Nanostrukturen als Signalwandler für Erkennungsreaktionen verwendet werden. In diesem Fall wird die Änderung des lokalen Brechungsindex indirekt über die Änderung des Spektrums gemessen. Die zweite Möglichkeit besteht in der Verwendung von Nanopartikeln als bioanalytische Marker, wobei die Entstehung der Nanostruktur über eine Erkennungsreaktion detektiert wird.<sup>5</sup>

### 4.4.1 LSPR-Sensing

#### LSPR-Sensing mit Änderung des globalen Brechungsindex

Eine Untersuchung der Hybridnanostrukturen zur Messung von Änderungen im Brechungsindex soll hier anhand verschiedener Messungen demonstriert werden. Dabei wird zwischen Messungen des globalen und des lokalen Brechungsindex unterschieden. Um den globalen Brechungsindex zu bestimmen, wurden Lösungen mit unterschiedlich hohem Glukoseanteil sowie Wasser und Luft verwendet. Die größte Änderung im globalen Brechungsindex findet beim Übergang von Luft ( $n = 1,0001$ ) zu Wasser ( $n = 1,3325$ ) statt. Es wurden zusätzlich Glukoselösungen mit 1% bis 5% Glukoseanteil und mit einem Brechungsindex zwischen 1,333 und 1,337 verwendet. Glukoselösungen mit höherem Brechungsindex sind für die Mikroskopie nicht geeignet, da die Objektive dafür nicht korrigiert sind und es somit zu Abbildungsfehlern kommt. Durch die Veränderung des Brechungsindex verändert sich sowohl die spektrale Antwort der Einzelstrukturen als auch die der Hybridnanostruktur. Die Wellenlängen des Nanoholepeaks und der Plasmonenresonanz der Nanopartikel verschieben sich mit zunehmendem Brechungsindex zu höheren Wellenlängen. Dieses Verhalten ist auch bei der Hybridnanostruktur detektierbar. Wie in Abb. 4.30 zu sehen ist, ändert sich die spektrale Antwort beim Übergang von Luft zu Wasser, wobei die Partikel mit 100 nm Durchmesser eine größere Änderung als die 80 nm großen Partikel aufweisen. Es muss aber festgestellt werden, dass sowohl die Änderungen als auch die Messungen schwer vergleichbar sind, weil das Objektiv durch ein speziell für die Messung in Flüssigkeiten geeignetes Wasserimmersionsobjektiv ersetzt werden musste. Das Wasserimmersionsobjektiv hat jedoch eine höhere numerische Apertur als das Objektiv für die Trockenmessungen. Ändert sich der Brechungsindex der Flüssigkeit (Abb. 4.31), so kann die spektrale Änderung sehr gut verfolgt werden. Die Änderungen für die hier dargestellten Messungen bewegen sich im Bereich von 0,5 nm bis 3 nm. Der erste Wert liegt mit 0,5 nm nahe an der Auflösungsgrenze des Spektrometers und kennzeichnet damit die untere Detektionsgrenze, die sich aufgrund des verwendeten optischen Gitters im Spektrometer im Zusammenhang mit der verwendeten Kamera ergibt. Da der

---

<sup>5</sup>siehe Kap.2.2

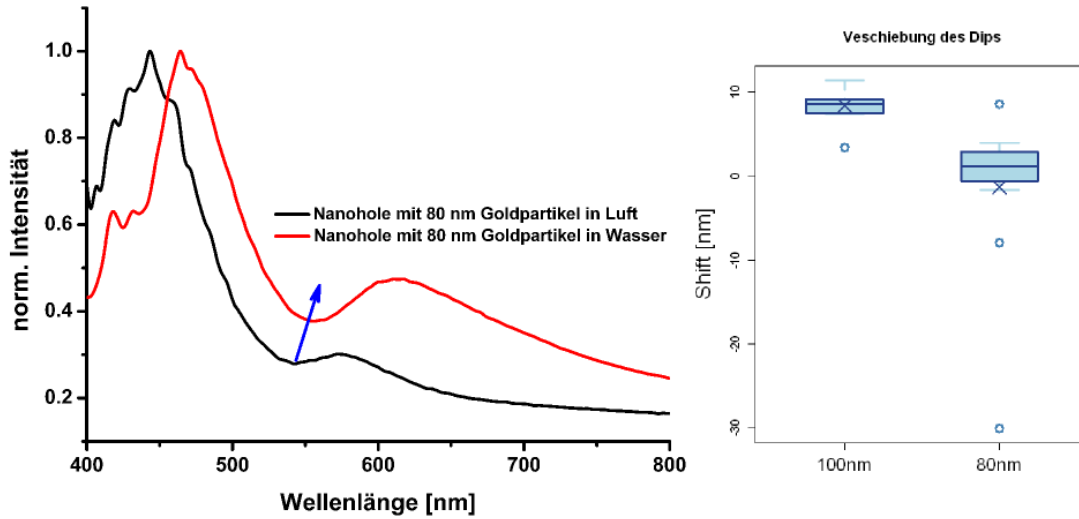


Abb. 4.30: Spektrale Verschiebung durch Änderung des globalen Brechungsindex

Brechungsindex nur in einem sehr kleinen Bereich geändert werden konnte, unterscheiden sich die Messwerte auch nicht signifikant voneinander, was wiederum eine Abschätzung der Sensitivität als Verhältnis von Ausgangssignal zu Eingangssignal ( $S = d\lambda/dn$ ) schwierig macht. Dennoch lässt sich aus den Medianwerten eine Sensitivität berechnen, die als eine erste Abschätzung für das Potential als Sensorelement dienen. Die Sensitivität ergibt sich mit  $S = \frac{\Delta\lambda}{\Delta n}$  zu  $\frac{3,43}{0,0038} = 903$ . Dieser Schätzwert zeigt deutlich das sensorische Potential der Hybridnanostruktur. Wird dieser Wert mit Werten aus der Literatur<sup>[119]</sup> verglichen, so liegt er deutlich über dem anderer Sensorelemente wie zum Beispiel Goldnanorods ( $S = 400$ ). Allerdings gibt es noch keine Statistiken, die diesen Wert weiter belegen. Doch würde eine derartige Sensitivität die Nanostruktur zu einem hervorragenden Sensorelement für die Bioanalytik machen, da eine hohe Sensitivität auch eine geringe Nachweisgrenze für Moleküle bedeutet.

### LSPR-Sensing mit dem Molekül Mercaptohexanol

Um ein besseres Modell zur Abschätzung spektraler Änderungen im lokalen Brechungsindex zu erhalten, wurde zusätzlich der Modellanalyt Mercaptohexanol eingesetzt. Dieses Molekül besitzt einen hohen Brechungsindex und bindet spezifisch an Goldoberflächen, weshalb sich die Anbindung von Mercaptohexanol spektral gut verfolgen lässt. Hierbei ändert sich nur der Brechungsindex in der lokalen Umgebung um den Partikel. Um bei der Anbindung des Mercaptohexanols nur die tatsächliche Anbindung sichtbar zu machen, wurden die Substrate in mehreren Schritten gereinigt. Während dieser Reinigung wurde eine Rotverschiebung an den gemessenen Dips sichtbar, die vermutlich auf die Entfernung von Oberflächendetergenzien zurückzuführen ist. Die eigentliche Anbindung des Mercaptohexanols induziert eine Blauverschiebung (Abb. 4.32). Das ist insofern ungewöhnlich, weil bei Messungen an plasmonischen Nanostrukturen stets eine Rotverschiebung gemessen wird, wenn Moleküle mit hohem Brechungsindex anbinden. Dennoch lässt sich für die hier entwickelte Hybridnanostruktur die Blauverschiebung statistisch signifikant belegen. So wie sich die Anbindung des Mercaptohexanols spektral bemerkbar macht, kann auch die Entfernung des Moleküls genutzt werden. Wie aus Abb. 4.32 hervorgeht, verschiebt sich die Wellenlänge des Dips bezogen auf den Anfangszustand durch Entfernen des Mercaptohexanols wieder in Richtung roter Wellenlängen in die Nähe des Startwerts.

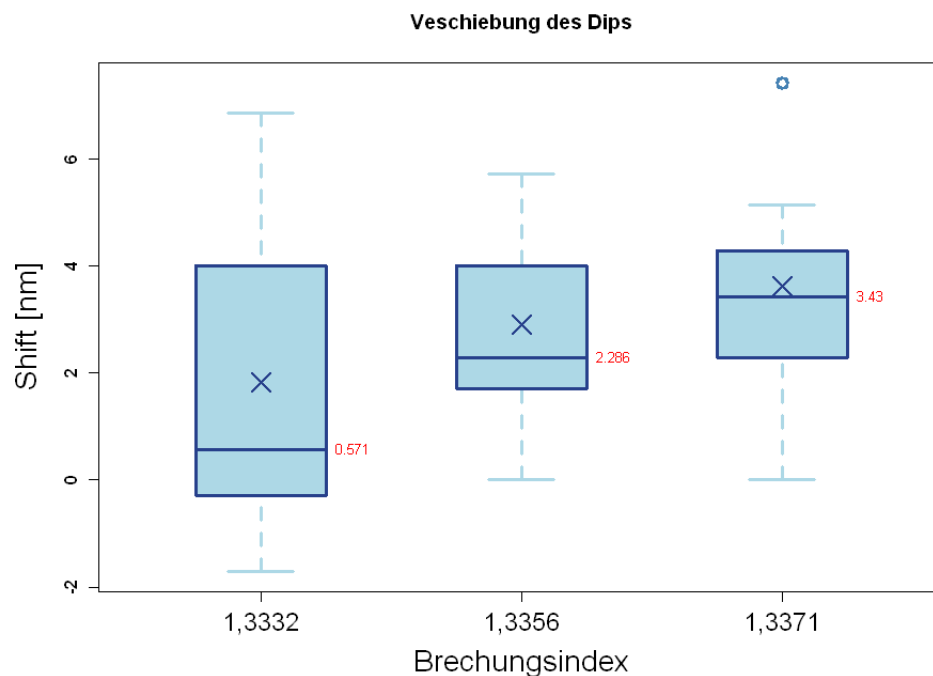


Abb. 4.31: Spektrale Änderung durch Verwendung unterschiedlicher Glukoselösungen in Abhängigkeit vom globalen Brechungsindex

### LSPR-Sensing mit bioanalytischer Applikation

Die Ergebnisse der Messungen der spektralen Antwort bei der Anbindung von Mercaptohexanol machen deutlich, dass eine Detektion von biologischen Erkennungsreaktionen mit dieser Hybridnanostruktur möglich ist. Deshalb wird im nächsten Schritt an einem biologischen Testsystem die Erkennung einer spezifischen DNA-Sequenz demonstriert.

Das biologische Modellsystem besteht aus einer Fängersequenz, welche an die in den Nanoholes befindlichen Nanopartikel gebunden wird. Dabei wurde mit Konzentrationen von jeweils 1  $\mu$ M sowohl für die Fänger- als auch für die Testsequenz gearbeitet, um ein ausreichendes Signal sicherzustellen. Die Anbindung erfolgt über eine Thiol-Gruppe an einem Ende des DNA-Stranges. Diese Gruppe besitzt aufgrund ihres Schwefelatoms eine hohe Affinität zu Goldoberflächen. Die Anbindung des Fängermoleküls an den Transducer (Goldnanopartikel) ist spektral messbar, genau wie die Anbindung von Mercaptohexanol. Der eigentliche Nachweis der DNA erfolgt erst bei der Anbindung eines komplementären Stranges (Analyt) an den Sensor bei einer Hybridisierungsreaktion. Dabei wird das Transducersignal ausgelesen. Die Anbindung äußert sich in einer spektralen Verschiebung bezogen auf die Verschiebung nach der Anbindung des Fängermoleküls. Abb. 4.33 zeigt, dass sich der Dip nach Anbindung des Fängermoleküls um ca. 20 nm in Richtung blau verschiebt. Eine Hybridisierung, das heißt, das Anbinden des komplementären Stranges, bewirkt wiederum eine weitere Verschiebung in Richtung blau um 20 nm. Diese Blauverschiebung ist ein interessanter Effekt, da bei der Anbindung von Molekülen mit hohen Brechungsindizes eigentlich eine Rotverschiebung im Spektrum zu erwarten wäre. Bisher zeigten jedoch alle Versuche eine reproduzierbare Blauverschiebung. Da sämtliche Messungen in Transmission vorgenommen wurden, liegt die Vermutung nahe, dass die Anbindung von Molekülen eine Blauverschiebung in der Absorption verursacht. Die Nutzung des biologischen Testsystems zeigte,



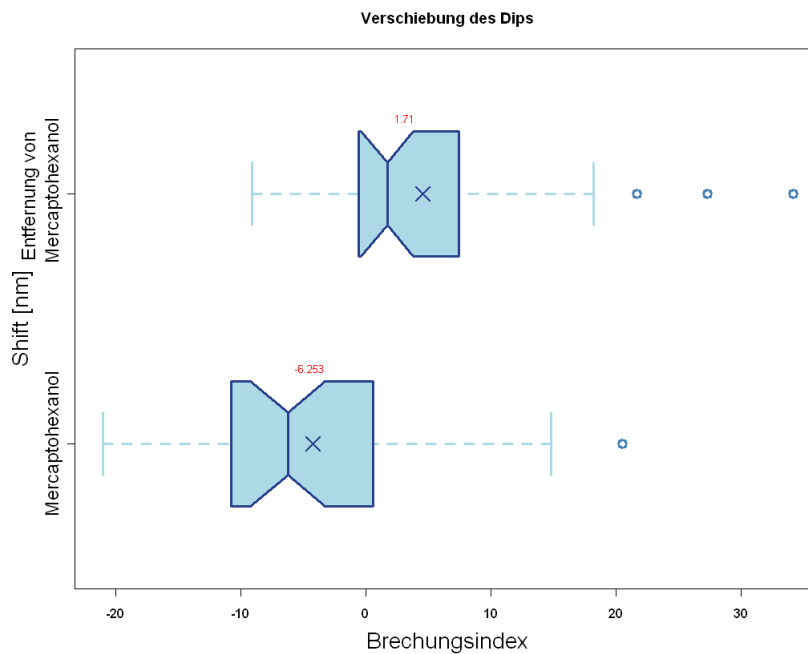


Abb. 4.32: Spektrale Änderung mit Änderung des Brechungsindex durch Anbindung von Mercaptohexanol

dass ein Nachweis von Erkennungsreaktionen in jedem Fall möglich ist und die Hybridnanostruktur daher sehr gut in bioanalytischen Aufgabenstellungen Anwendung finden kann.

#### 4.4.2 Nachweis von Nanopartikelmarkern

Die zweite Möglichkeit für die Verwendung der Hybridnanostruktur in der Bioanalytik ist die Nutzung von Nanopartikeln als optische Label. Dabei wird ein Fängermolekül im Nanohole immobilisiert und anschließend das komplementäre Gegenstück an das Fängermolekül hybridisiert. Das Ereignis kann einfach durch die Änderung der optischen Eigenschaften detektiert werden, da das Gegenstück (Analyt) vorher mit einem Nanopartikel markiert wurde. Das Auslesen der Hybridnanostruktur stellt kein Problem dar, wie in den Kapiteln 4.3.2 und 4.3.2 bereits beschrieben wurde. Vielmehr ist hier ein deutliches Messsignal zu erwarten, was sich gut abgrenzen lässt. Die Herausforderung besteht jedoch in der gezielten Anbindung von Biomolekülen im Nanohole. Dazu wurden nach Anbindung der Monolagen doPhosAc und GOPS (siehe Kap. 4.3.1) die Fängermoleküle immobilisiert. Das Fängermolekül war hier eine Sequenz, die kompatibel zur DNA der *Bakteriophage Lambda* ist, welche in der Gentechnik als Vektor eingesetzt wird. Um eine Anbindung an die Monolage sicherzustellen, wurde die ausgewählte Sequenz am Ende mit einer Aminogruppe modifiziert. Weiterhin wurde zwecks zusätzlicher Kontrolle das andere Ende der DNA-Sequenz mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Um die Anbindung besser optisch verfolgen zu können, wurden in einem Chromsubstrat Löcher mit einem Durchmesser von 10  $\mu\text{m}$  hergestellt. Diese Löcher sind groß genug, um in ihnen auch die Fluoreszenz messen zu können. Damit kann abgeschätzt werden, wie gut die Partikel an der Oberfläche anbinden, ohne sich über die Benetzungseigenschaften der Nanoholes Gedanken machen zu müssen.

In Abb. 4.34 sind in der ersten Spalte die Löcher in einer Dunkelfeldanordnung vor der Immobilisierung der Fänger dargestellt. Die beiden unterschiedlichen Löcher befinden sich auf zwei unterschiedlichen



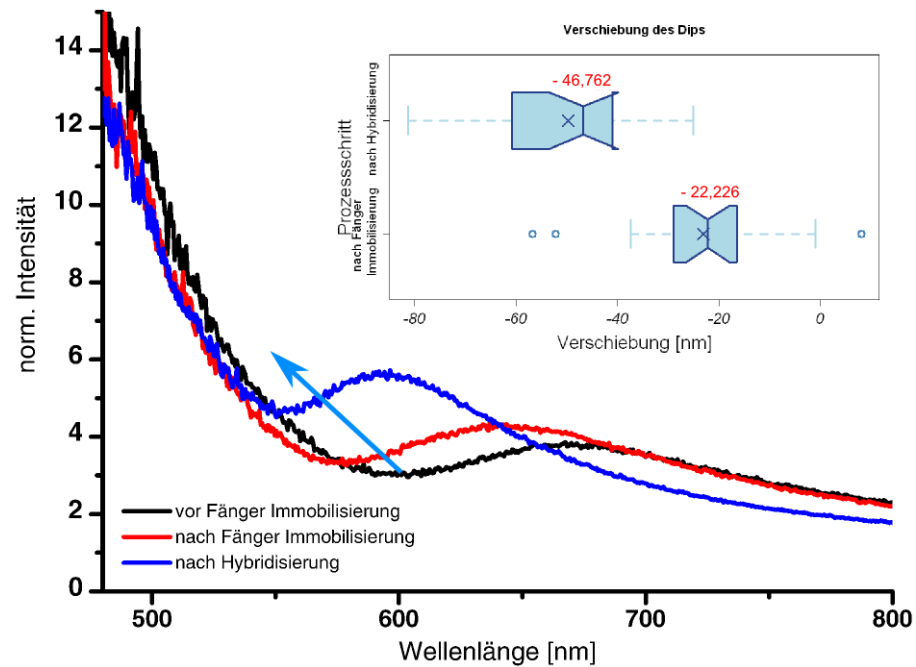


Abb. 4.33: Test eines biologischen Systems an der Hybridnanostruktur

Substraten, dennoch unterscheiden sie sich im Mikroskop nicht, was einen Vergleich der nachfolgenden Prozessschritte ermöglicht. Bei der Betrachtung der Fluoreszenzsignale nach der Immobilisierung der Fängermoleküle zeigen sich allerdings Unterschiede. Die obere Reihe in Abb. 4.34 zeigt gar keine Fluoreszenz, da hier keine Fängermoleküle angebunden wurden. Allerdings ist auf der Oberfläche ein Hintergrund sichtbar, während das Loch selber fast unsichtbar blieb. Im Gegensatz dazu ist in der unteren Reihe eine deutliche Fluoreszenz im Loch erkennbar, was ein Hinweis darauf ist, dass die Fängermoleküle im Loch angebunden haben. Die spezifische Anbindung von Fängermolekülen im Loch ist ein wichtiger Schritt für die Verwendung des Protokolls zum Nachweis nanopartikelmarkierter DNA. Wie die Fluoreszenzbilder zeigen, ist es prinzipiell möglich, gezielt Fängermoleküle in Löchern zu immobilisieren und dabei verschiedene Monolagen für die Oberflächen zu nutzen. Allerdings geben die Fluoreszenzbilder keinen Aufschluss darüber, ob auch ungewollt Fängermoleküle angebunden haben, da die Fluoreszenz an Metalloberflächen unterdrückt wird. Um eine unspezifische Anbindung der nanopartikelmarkierten DNA zu vermeiden, wurde die Oberfläche zusätzlich geblockt.<sup>[126]</sup>

Nach der Hybridisierung der Fängermoleküle mit der nanopartikelmarkierten DNA wurde mittels Mikroskop im Dunkelfeld versucht, die Partikel in den Löchern sichtbar zu machen. Die Ergebnisse der Hybridisierung sind in Abb. 4.34 ganz rechts zu sehen. Zunächst muss festgestellt werden, dass viele Partikel auf der eigentlich geblockten Chromoberfläche liegen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Blockierung der Oberfläche nicht effektiv genug war. Weiterhin ist zu erkennen, dass im Fall der komplementären DNA quantitativ mehr Partikel im Loch gebunden haben als für den Fall ohne Fängermoleküle im Nanohole.

Insgesamt sind die Ergebnisse der Immobilisierung der Nanopartikel trotzdem als zufriedenstellend zu betrachten, weil eine spezifische Anbindung der nanopartikelmarkierten DNA (Analyt) und deren Nachweis gut möglich ist. Die Protokolle müssten für eine effizientere Markierung aber noch optimiert werden. Dennoch zeigen diese ersten Versuche, dass eine Anbindung von markierter DNA

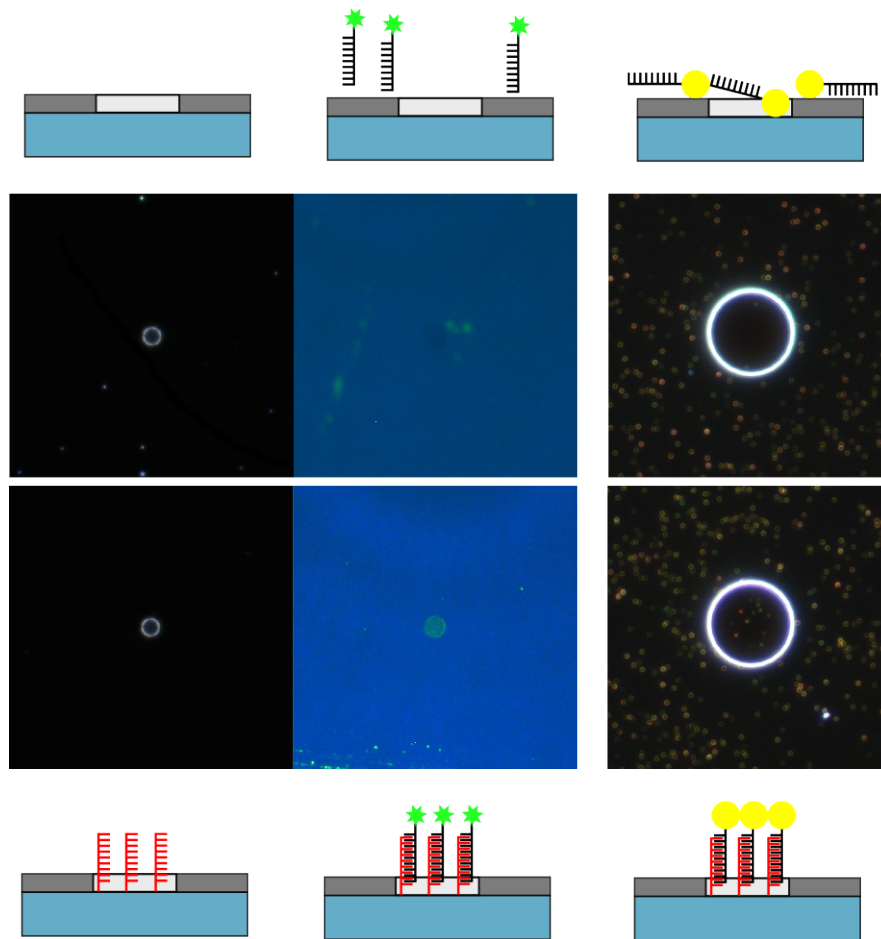


Abb. 4.34: Immobilisierung von nanopartikelmarkierter DNA, oben: ohne Fänger-moleküle (Negativkontrolle) unten: mit komplementärer Fängersequenz

im Loch prinzipiell möglich ist und dass sich das Biochipprinzip mit Hilfe der hier entwickelten Hybridnanostruktur umsetzen lässt.

## 4.5 Erweiterung der Messtechnik mittels hyperspektraler Bildgebung

Unter spektraler Bildgebung ist die Aufnahme von Bildern zu verstehen, die neben der Abbildung auch noch spektrale Zusatzinformationen enthält. Mit dem Zusatz „hyper“ ist dabei ein Bild gemeint, das deutlich mehr als 5 spektrale Kanäle besitzt. Die Möglichkeit, Bilder mit einer hohen spektralen Information aufzunehmen, verbindet idealerweise Weise beide Ansätze, die bei der Charakterisierung von Nanoholes betrachtet wurden, nämlich die spektrale serielle Aufnahme mit paralleler Bildauswertung. Ansätze, die eine spektrale Bildgebung verfolgen, arbeiten im Allgemeinen mit Gitterspektrometern und einer scannenden Optik. Das Bild wird dabei auf einen Spalt abgebildet und das Licht, welches den Spalt passiert, wird zeilenweise an einem Gitter spektral zerlegt und auf die Zeilen einer CCD-Kamera abgebildet. So entsteht von jedem Pixel in der Spalte ein Spektrum. Wird nun der Spalt oder das Objekt verschoben, resultiert daraus ein komplettes hyperspektrales Bild. Der Nachteil an diesem Verfahren ist der hohe gerätetechnische Aufwand. Auch lässt es sich

nicht ohne Weiteres für die Messung von Nanoholes umsetzen. Eine Alternative ist daher eine direkte Integration der hyperspektralen Bildgebung ins Mikroskop, was durch die Verwendung eines Fourier-Transformationsspektrometers realisierbar ist.

In dieser Arbeit wurde eine Kombination aus Mikroskop und Fourier-Transformationsspektrometer zur hyperspektralen Bildgebung nach Tseng<sup>[127]</sup> an Nanostrukturen aufgebaut und getestet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Spektrometer mittels Baukastensystem von ThorLabs auf einem Breadboard als Testaufbau realisiert und in Betrieb genommen. In Abb. 4.35 ist das Konzept des abbildenden Spektrometers (ImSpek) dargestellt. Das so genannte ImSpek besteht aus drei Hauptkomponenten: einer Lampenbaugruppe, der Interferometergruppe sowie einer Mikroskopbaugruppe. Die Lampengruppe nutzt eine laserinduzierte Plasmalichtquelle, die ein kontinuierliches Spektrum im Bereich von 190 nm bis 800 nm aufweist und eine hohe Intensität liefert. Zur optimalen Nutzung dieser Lichtquelle wurden zwei asphärische Kondensorlinsen und zwei Blenden verwendet und somit eine Köhlersche Beleuchtung realisiert. Dadurch wurde sowohl im Durchlichtmodus als auch im Auflichtmodus eine homogene und intensitätsstarke Ausleuchtung gewährleistet. Der Aufbau ist so gestaltet, dass sich beide Beleuchtungsvarianten (Auflicht und Durchlicht) einfach realisieren und umbauen lassen, da mit diesem Aufbau auch Streuspektren von Nanopartikeln aufgenommen werden sollen.

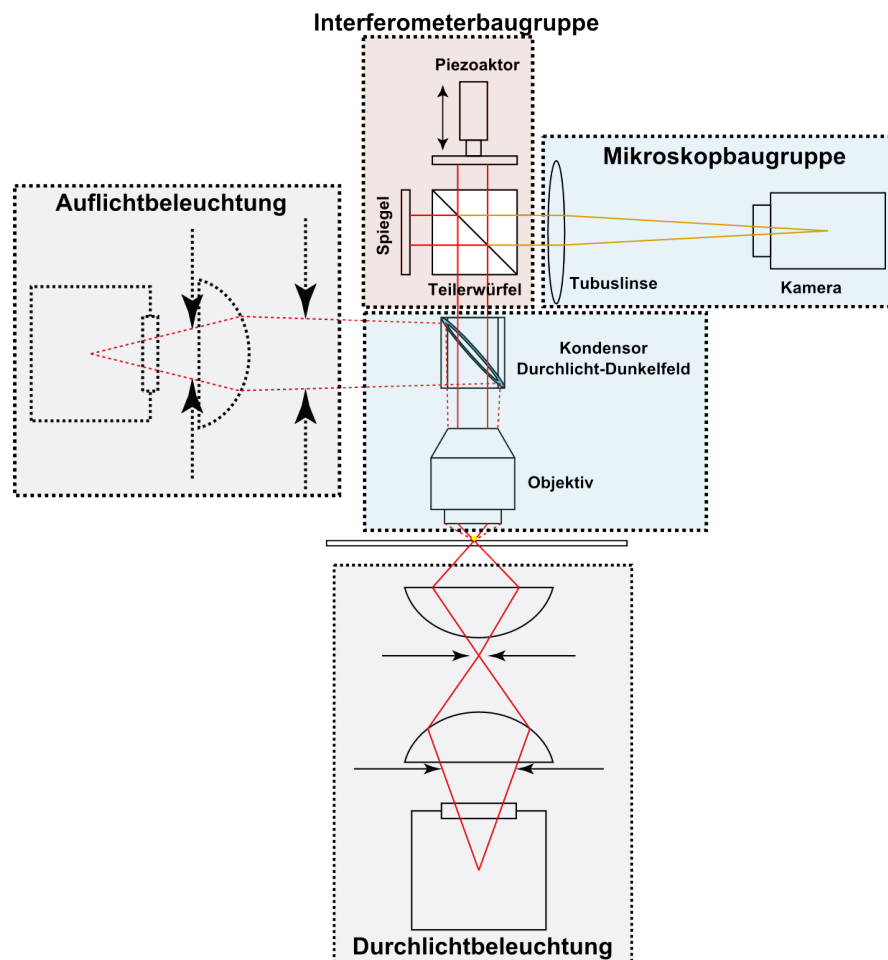


Abb. 4.35: Konzept eines bildgebenden Spektrometers (ImSpek) basierend auf einem Fourier-Transformationsspektrometer

Die Mikroskopbaugruppe realisiert die Bildgebung des Spektrometers und ist mit nur wenigen Komponenten ausgestattet. Im Grunde kann jedes Mikroskop auf drei Komponenten reduziert werden: das Objektiv, die Tubuslinse und die Kamera. Das Objektiv ist dabei die entscheidende Komponente. Um eine hohe Bildqualität zu erreichen, wurden Objektive von Zeiss verwendet, die neben einer sehr guten Korrektur für Abbildungsfehler auch für Hell- und Dunkelfeldbeleuchtung geeignet sind. Da diese Objektive eine ICS-Optik (Infinity-corrected System (ICS)) nutzen und somit eine passende Tubuslinse benötigt wird, wurde hier eine speziell für Zeissobjektive angepasste Tubuslinse gewählt. Letztlich wurde eine Kamera mit hoher Empfindlichkeit und kleiner Pixelgröße ausgewählt, um auch kleine Objekte gut abbilden zu können.

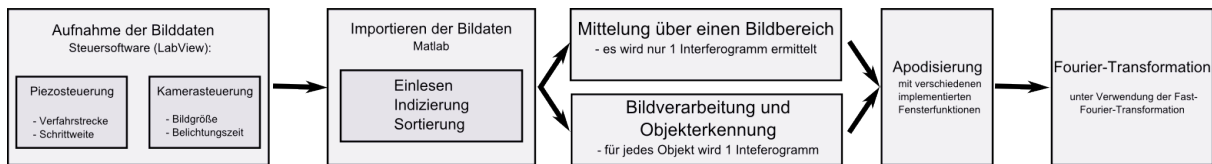


Abb. 4.36: Blockdiagramm der Prozessschritte für das ImSpek

Die Interferometerbaugruppe dient der spektralen Messung basierend auf der Weißlichtinterferenz. Sie besteht, wie in Abb. 4.35 zu sehen, aus einem Teilerwürfel mit einer 50 : 50-Teilung sowie einem festen und einem beweglichen Spiegel. Der bewegliche Spiegel wird über einen Piezolinartisch verfahren und hat einen Fahrweg von maximal 500  $\mu\text{m}$ . Die Spiegel können mit drei Freiheitsgraden justiert werden, so dass eine perfekte Überlagerung der Bilder möglich ist. Der Aufbau entspricht damit einem Michelson-Interferometer, das zwischen Objektiv und Tubuslinse gesetzt wurde. Da in diesem Bereich die Lichtstrahlen parallel sind und das Bild nach unendlich abgebildet wird, hat das Interferometer für alle Bildpunkte die gleiche Wirkung. Die Interferometerbaugruppe besteht aus einem Teilerwürfel und je einen festen und beweglichen Spiegel. Letzterer wird von einem Piezoaktor bewegt. In der Fourier-Transformationsspektroskopie spielt die Fahrstrecke eine große Rolle, da sie die Auflösung des Spektrometers maßgeblich bestimmt. Je länger die Strecke, desto höher die Auflösung. Der hier verwendete Piezoaktor hat eine Weglänge von 30  $\mu\text{m}$  und erreicht damit eine Auflösung von ca. 4 nm. Für diesen Testaufbau ist die Messung der Laserinterferenz die einzige Möglichkeit, das Spektrometer zu kalibrieren. Die Bestimmung der Auflösung erfolgt durch die Messung der spektralen Breite der Interferenz eines Laserstrahls mit  $\lambda = 532 \text{ nm}$  nach der Fourier-Transformation des Interferogramms. Im Vergleich zur realen spektralen Breite der Laserlinie ist die Auflösung des Spektrometers gering. Daher wird die gemessene spektrale Breite allein durch die Auflösung des Interferometers bestimmt und kann somit direkt aus dem Spektrum abgelesen werden.

Um den Gesamtaufbau (Optik, Interferometer und Software) zu testen, wurden verschiedene Testmessungen an Mikrostrukturen im Durchlicht durchgeführt. Um eine definierte spektrale Charakteristik zu erhalten, wurde im Beispiel von Abb. 4.37 ein Interferenzfilter für eine Wellenlänge von 500 nm verwendet. Dazu wurde für das bildgebende Spektrometer eine Ansteuersoftware entwickelt, die zum einen den Piezo positioniert und zum anderen die Kamera steuert und die Datenspeicherung übernimmt. Aufgrund der guten Handhabung und der leichten Modifizierbarkeit von LabView wurde das Steuerprogramm damit realisiert. Durch die hohe Menge an Bilddaten wurde ein Auswertescript in MatLab geschrieben, um die Interferogramme mittels FFT zu verarbeiten.

Die Datenverarbeitung wurde in verschiedenen Stufen durchgeführt. Die einzelnen Blöcke sind in Abb. 4.36 dargestellt. Nach der eigentlichen Messung mittels eines selbst geschriebenen

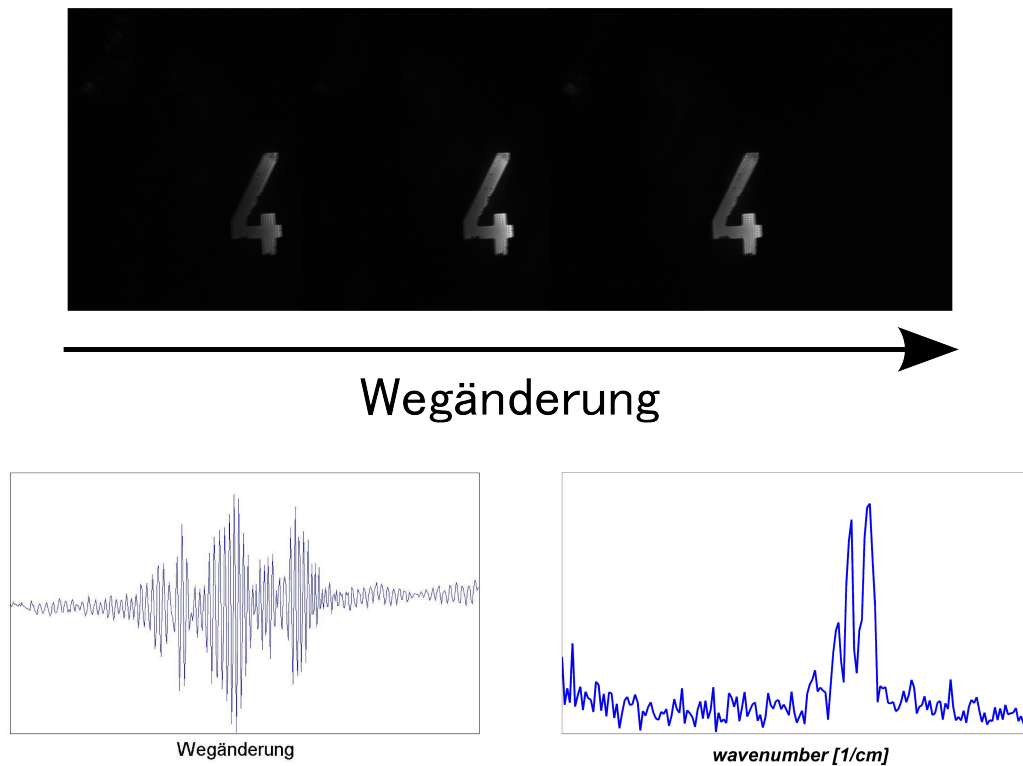


Abb. 4.37: Testmessung mit bildgebenden Spektrometers

LabView-Steuerprogramms, werden die Bilder einzeln eingelesen und nach ihrer Reihenfolge sortiert. Danach besteht entweder die Möglichkeit, über einen Bildbereich einen Mittelwert zu bilden oder aber die einzelnen Bildobjekte zu erkennen und damit weiterzuarbeiten. Die Mittelung bietet bei Testmessungen mit wenigen Objekten den Vorteil, dass sich durch die globale Mittelwertbildung der Datensatz erheblich verkleinert und so die Verarbeitung beschleunigt. Durch Erkennung einzelner Objekte im Bild ist es möglich, von jedem Objekt ein Spektrum zu erhalten und somit viele Nanoobjekte gleichzeitig zu messen. An den Interferogrammen wird eine Apodisierung mit den unter Kap. 3.6.3 beschriebenen und implementierten Fensterfunktionen durchgeführt. Abschließend erfolgt die Fourier-Transformation zur Erzeugung des Spektrums, das dann zum Beispiel über den Betrag der komplexen Fourier-Transformation angezeigt werden kann. Wie in Abb. 4.37 dargestellt, lässt sich das Testobjekt, eine mikrostrukturierte Vier, sehr gut abbilden. In Abb. 4.37 oben wird die Änderung des Kamerabildes bei Durchgang durch den Null- und Interferenzpunkt gezeigt. Anhand der Abbildung wird auch deutlich, dass es möglich ist, eine Weißlichtinterferenz zu erzeugen und aufzuzeichnen. Wird diese Interferenz mittels Fouriertransformation in die spektrale Information umgerechnet, so entsteht das in Abb. 4.37 abgebildete Spektrum. In diesem Spektrum ist ein Peak deutlich erkennbar, auch wenn dieser ein hohes Rauschen aufweist. Die Spektren wurden, wie im Kap. 3.6.3 beschrieben, mittels Linearfit auf die Nulllinie gebracht und anschließend wurde eine Fensterfunktion genutzt um das Spektrum zu wichten. Abschließend wird der Betrag der komplexen Fourier-Transformation im Diagramm dargestellt. Für diese Messung wurde ein Bandpassfilter mit 500 nm Wellenlänge verwendet, um eine definierte spektrale Charakteristik zu erhalten. Weiterführende Messungen mit einem Laser ergaben, dass sich Spektren mit diesem Aufbau aufnehmen lassen. Da sich der Aufbau in der Testphase befindet, müssen noch Verbesserungen in der Software zur Auswertung von Spektren vorgenommen werden. Allerdings ist es möglich, Spektren für jeden einzelnen Bildpunkt aufzunehmen. Damit bildet

dieser Aufbau die ideale Kombination aus effektiver paralleler Auswertung der Nanoholes mit einer hohen spektralen Auflösung.

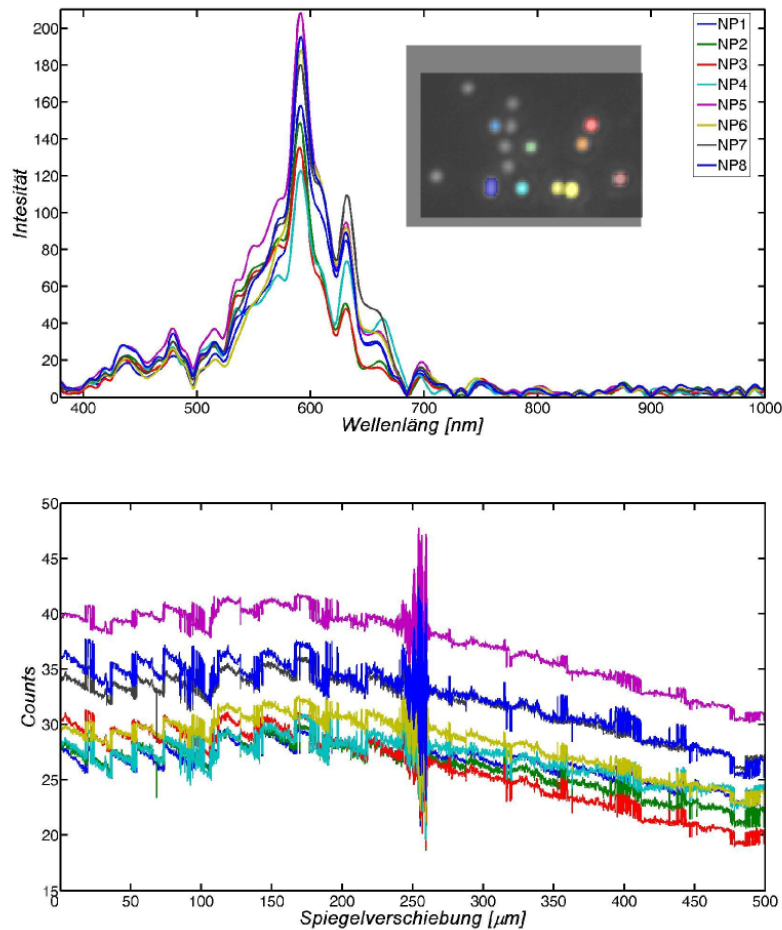


Abb. 4.38: Messung an Goldnanopartikeln mit Bilderkennung

In einer anderen Konfiguration des Imaging-Spektrometers wurde ein Lineartisch mit einer Verschiebung von 500  $\mu\text{m}$  genutzt. Damit konnte die Auflösung des Spektrometers auf ca. 0,17 nm erhöht werden. Des Weiteren wurden die in dieser Arbeit entwickelten Auswerteprogramme weiter verbessert und um eine Objekterkennung erweitert. Dabei wurde auf die schon zuvor verwendeten Algorithmen zur Objekterkennung zurückgegriffen, um nur relevante Bildobjekte verarbeiten zu müssen und den Prozess zu beschleunigen. Die Auswerteprogramme wurden um verschiedene Fensterfunktionen erweitert sowie ein Zerofilling implementiert. Zusätzlich konnte die Geschwindigkeit der Datenverarbeitung erhöht werden, in dem nur noch relevante Bildbereiche ausgewertet wurden. Durch die Bildverarbeitung lassen sich, wie in Abb. 4.38 dargestellt, einzelne Objekte im Bild erkennen und gleichzeitig verarbeiten. Die Bildverarbeitung erfolgt dabei wie in Kap. 2.4 beschrieben mittels Watershed-Transformation. In Abb. 4.38 sind neben den erkannten Objekten auch die Interferogramme sowie die errechneten Spektren zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass es möglich ist, viele Objekte, in diesem Fall Goldnanopartikel, gleichzeitig zu detektieren, parallel zu verarbeiten und die Spektren zu errechnen.

Durch den Einsatz einer Referenzmessung mit einem grünen Laser können die Maxima der Partikelstreuung errechnet werden. Auch lässt sich dieses Spektrometer sowohl in der Durchlicht- als

auch in der Aufsichtskonfiguration verwenden. Mit diesem Aufbau ist eine parallele spektrale Detektion multipler Objekte innerhalb kurzer Zeit möglich, was eine Hochdurchsatzauswertung von Biosensoren ermöglicht. Das hier entwickelte Spektrometer bildet die Verbindung zwischen der parallelen Messung und Auswertung der Hybridnanostruktur mittels Bildverarbeitung und hoher spektraler Auflösung, die für die Messung von Biosensoren notwendig ist.





## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Reaktionen und die quantitative Messung von Molekülen ist von großer Bedeutung in den Lebenswissenschaften. Mit den Methoden der Bioanalytik lassen sich zum Beispiel Krankheitserreger aufspüren oder biologische Prozesse verfolgen. Aus diesem Gebiet besteht auch die Forderung nach neuen sensitiveren und schnelleren Messsystemen, die eine präzise Detektion erlauben.

Mit dieser Arbeit ist ein wichtiger Beitrag zum Aufbau eines kompakten, automatisierten und hochsensitiven Messsystems für die Bioanalytik gelungen. Die Basis dieses Messsystems bildet eine neuartige Nanostruktur auf Basis der LSPR. Diese Hybridnanostruktur hat aufgrund ihrer hohen Sensitivität das Potential, Teil eines umfassenden bioanalytischen Messsystems zu werden. Die Untersuchungen mittels Mikrospektroskopie und Bildverarbeitung verdeutlichen die Möglichkeiten dieses Sensorelementes und zeigen, wie diese Nanostruktur gemessen, ausgewertet und für die Bioanalytik genutzt werden kann.

Ein neukonstruiertes hyperspektrales bildgebendes Spektrometer bildet die Grundlage für die Messung der Nanostrukturen mit einer hohen räumlichen und spektralen Auflösung. Dabei kann gerade die neue Hybridnanostruktur als bioanalytisches Sensorelement leicht in das bildgebende Spektrometer integriert werden. Gemeinsam bilden die neue Nanostruktur und das neu gebaute Spektrometer ein komplexes Messsystem für die Bioanalytik. Dieses System zeichnet sich aufgrund der verwendeten Nanostruktur durch eine hohe biosensorische Empfindlichkeit aus. Gleichzeitig können die Sensorelemente mittels bildgebenden Spektrometers parallel und spektral präzise ausgelesen werden.

Die Grundlage der hier behandelten neuen optischen Hybridnanostruktur bildeten Nanoholes in einem Chromfilm. Diese Löcher dienen als optische Maske, mit deren Hilfe sich die optischen Signale von plasmonischen Nanopartikeln detektieren lassen. Im Gegensatz zu der sonst üblicherweise verwendeten Dunkelfeldanordnung vereinfacht sich durch die Nanostruktur die optische Anordnung und die Plasmonenresonanz wird in Transmission messbar. Aus diesem Grund ist auch eine minimalisierte und miniaturisierte Ausleseinheit realisierbar, die ähnlich einem Scanner nur mit Hilfe einer CCD-Zeile die Plattform auslesen kann. Diese Vereinfachungen machen die neuentwickelte Hybridnanostruktur zu einer interessanten Plattform für weitere Applikationen. Um das Potential der neuen Nanostruktur nutzen zu können, wurde eine umfassende Charakterisierung der optischen Eigenschaften und umfangreiche Versuche zur Herstellung der neuen Struktur durchgeführt. Erst durch diese Versuche war es möglich, Erfahrungswerte in Bezug auf Herstellung und optische Eigenschaften zu erhalten.

Die einzelnen Elemente der Hybridnanostruktur, wie zum Beispiel die Nanopartikel, wurden genau charakterisiert, wobei insbesondere die Größenverteilung der Partikel untersucht wurde. Diese spielt eine entscheidende Rolle, wenn die Partikel nicht im Ensemble, sondern einzeln gemessen werden, wie im Fall der Hybridnanostruktur. Mit Hilfe dieser Charakterisierung konnte die breite spektrale Statistik der neuen Nanostruktur erklärt werden. Durch die Herstellung und Untersuchung von Silbernanoprismen konnte gezeigt werden, dass sich die spektralen Eigenschaften dieser neuen Struktur noch beeinflussen lassen. Die Silbernanoprismen erlauben die Einstellung einer bestimmten Plasmonenresonanz in einem weiten spektralen Bereich und erlauben durch die Assemblierung der Nanoprismen in den Nanoholes, diesen spektralen Bereich auch für die neue Hybridnanostruktur zu nutzen.

Ein weiterer Schwerpunkt der Untersuchungen in dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Chrom-Nanoholes. Mittels Mikrospektroskopie und Bildverarbeitung konnte der deutliche Zusammenhang zwischen einer dämpfenden Chromschicht und der Transmission der Nanoholes dargestellt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass sich sowohl Mikrospektroskopie als auch die Bildverarbeitung zur Charakterisierung dieser Nanostrukturen eignen. Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage für die Messung und Auswertung der neuhergestellten Hybridnanostruktur.

Zur Erzeugung der Nanostruktur wurden Edelmetallnanopartikel mit einer wohldefinierten Plasmonenresonanz in die Nanoholes gebracht. Durch Selbstassemblierung ließen sich die Nanopartikel mit einem sehr geringen unspezifischen Hintergrund in die Nanoholes immobilisieren. Um den Prozess der Erzeugung der Hybridnanostruktur steuern zu können, wurden verschiedene Methoden der Oberflächenmodifizierung getestet und optimiert. Neben einfachen Oberflächenmodifizierungsverfahren wie Plasmaätzen oder chemische Aktivierung wurden auch selbstorganisierende Monolagen eingesetzt. Der große Unterschied zwischen der einfachen Aktivierung und den Monolagen besteht zum einen in der Beständigkeit der Monolagen und zum anderen in deren Spezifität zu verschiedenen Oberflächen. Insbesondere wurde die Spezifität zu Chrom- und Glasoberflächen untersucht, da die Nanoholes aus diesen Materialien bestehen. Beim Testen der unterschiedlichen Modifizierungsverfahren stellte sich heraus, dass nur Monolagen aus 1-dodecyl-Phosphosphatsäure (doPhosAc) zu einer Verbesserung der Immobilisierung der Nanopartikel führen. So wies die Messung der Kontaktwinkel vor und nach der Anbindung der Monolage auf Chrom- und Glasoberflächen eine hohe Spezifität auf. Eine derartige Monolage führte zu einer hydrophoben Chromoberfläche, während die Glasoberfläche hydrophil blieb. Der Einsatz anderer Monolagen wie z. B. Mercaptohexanol zeigte keinen Unterschied in der Spezifität bei den Materialien Glas und Chrom, weshalb sich Monolagen mit Thiol-Gruppen (z.B. Mercaptohexanol) als ungeeignet für die hier verwendete Materialkomposition herausstellten.

Basierend auf der Monolage doPhosAc wurde erstmalig die gezielte Immobilisierung zweier Monolagen unterschiedlicher Spezifität getestet. Die Monolage 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (GOPS) sollte in einem nächsten Schritt zur Anbindung von DNA-Fängermolekülen dienen. Die Versuche zeigten, dass es durch einen zweistufigen Prozess möglich ist, mit doPhosAc die Chromoberfläche zu passivieren und anschließend das Glas mit GOPS zu funktionalisieren. Durch Kontaktwinkelmessungen konnte nachgewiesen werden, dass eine spezifische Anbindung der Monolagen an die jeweilige Oberfläche stattfindet und so eine gezielte Anbindung von aminomodifizierter DNA am Boden des Nanoholes möglich wird.

Um die Nanoholes für die Bioanalytik nutzen zu können, mussten nach der Herstellung der Hybridnanostruktur deren optische Eigenschaften charakterisiert werden. Zudem mussten geeignete Wege gefunden werden, um die zahlreichen Daten einfach und schnell verarbeiten zu können. Die Versuche haben gezeigt, dass Nanoholes prinzipiell auf zwei Wegen untersucht werden können, zum einen über mikrospektroskopische Untersuchungen und zum anderen über die Verarbeitung der Bilddaten der Mikroskopkamera. Um den Zusammenhang der optischen Eigenschaften zwischen Nanopartikeln und Nanoholes beurteilen zu können, wurden zudem alle optisch vermessenen Nanoholes zusätzlich ultramikroskopisch untersucht. Die ultramikroskopischen Daten des AFM und REM wurden mit optischen Daten verglichen und erlaubten es so, die Belegung eines Nanoholes mit Nanopartikeln zu kontrollieren.

Die mikrospektroskopische Untersuchung lieferte sehr detaillierte spektrale Informationen einzelner Nanoholes. Bei der Untersuchung der Daten stellte sich heraus, dass die spektralen Eigenschaften eines einzelnen Nanoholes mit Nanopartikeln durch eine geeignete Normierung gut sichtbar gemacht werden

können. Am geeignetsten erwies sich eine Normierung auf das Chromsubstrat, die als Ergebnis einen Dip liefert, der nur entsteht, wenn sich ein Partikel im Nanohole befindet. Anhand dessen wird eine automatisierte Klassifizierung der Ergebnisse ermöglicht. Dadurch werden die Daten vergleichbar und liefern zudem eine Statistik, mit der auf verschiedene Einflussfaktoren zurückgeschlossen werden kann. Ein erster Punkt, den die Statistik aufzeigte, ist der Einfluss der Verteilung des Partikeldurchmessers auf die Breite der Statistik. Verbreitert sich diese Größenverteilung der Partikel, so wird auch die Verteilung der Dipwellenlängen breiter. Eine Verbesserung der ermittelten Statistik der einzelnen Messwerte der Löcher ist nur über eine Optimierung der Partikelgrößenverteilung zu erreichen. Ein anderer Punkt, der durch die automatisierte Auswertung der Spektren realisiert werden kann, ist die Klassifizierung der spektralen Daten anhand der Dipwellenlänge. Dadurch kann auch die Anzahl der Partikel in einem Nanohole bestimmt werden. Die Klassifizierung nach Partikelanzahl kann im Bereich von einem bis vier Partikel im Nanohole erfolgen, da sich hier die gemessenen Spektraldaten signifikant voneinander unterscheiden.

Des Weiteren war es mit diesen Daten möglich, die Anzahl der Partikel im Nanohole und auf der Oberfläche zu ermitteln. So konnte durch eine automatisierte Bildauswertung der Kameradaten nicht nur die Anwesenheit eines Partikels im Nanohole nachgewiesen werden, sondern es zeigte sich auch, dass allein anhand der Bilddaten eine Bestimmung der Partikelanzahl möglich ist.

Diese Differenzierung ist zwar auch mit Hilfe der Kameradaten möglich. Eine Unterscheidung zwischen unterschiedlich großen Partikelsorten kann jedoch nur anhand der spektralen Daten getroffen werden, da diese eine spektrale Trennung möglicher Partikelvarianten ermöglichen. Dadurch können die Daten später für ein Multiplexing mehrerer Erkennungsreaktionen auf Basis verschiedener Partikelsorten genutzt werden. Ändern sich die plasmonischen Eigenschaften der Partikel, so kann das anhand der spektralen Daten nachgewiesen werden. In Versuchen, bei denen eine zusätzliche Silberschicht auf bereits immobilisierte Goldpartikel abgeschieden wurde, zeigte sich eine deutliche Verschiebung der Wellenlänge nach blau. Dieser Effekt tritt auch bei Goldnanopartikeln in Lösung auf. Er macht deutlich, dass die plasmonischen Eigenschaften gezielt von Partikeln in Nanoholes beeinflusst werden können. Damit eignet sich dieser Effekt sehr gut, um Änderungen an den Partikeln nachzuweisen.

Der letzte Abschnitt dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem Potential der neuen Hybridnanostruktur für bioanalytische Anwendungen. Hierbei wurde einerseits mit Hilfe von Testmolekülen die Verwendung als Biosensor untersucht. Zum anderen wurde ein möglicher Einsatz der Nanostruktur als Biochip zum Nachweis von mit Nanopartikeln markierter DNA analysiert.

Für den Einsatz der Nanostruktur als Biosensor ist eine hohe spektrale Auflösung nötig, da hier die spektralen Verschiebungen der Plasmonenresonanz, die durch das Anbinden der Moleküle entstehen, sehr gering sein können. Als Biosensor wird ein im Nanohole immobilisierter Nanopartikel genutzt, an dem zunächst das Fängermolekül angebunden wird. Anschließend wird dann das Targetmolekül hybridisiert. Als Testmolekül wurde hierbei eine DNA-Sequenz der Bakteriophage- $\lambda$  eingesetzt. Prinzipiell ist das Verfahren aber auch auf andere Sequenzen anwendbar, so dass sich unter anderem auch Krankheitserreger wie Salmonellen oder E.coli-Bakterien mittels der neuen Hybridnanostruktur nachweisen lassen. Messungen belegen, dass eine Nutzung dieser Nanostruktur als Biosensor sehr gut funktioniert. Die spektrale Verschiebung, die sich durch die Anbindung der Moleküle ergibt, ist groß genug, um die Anbindung und Hybridisierung von Molekülen sicher detektieren zu können. Die dabei auftretende Blauverschiebung der spektralen Signale ist zwar ungewöhnlich und noch nicht geklärt, aber die Messungen belegen die Verschiebung des Dips im Spektrum der Hybridnanostruktur infolge der Anbindung von DNA-Molekülen. Die Eignung der Hybridnanostruktur als Biosensor ist

damit nachgewiesen. Ein derartiger Biosensor in Kombination mit dem bildgebenden Spektrometer ist prädestiniert für den Einsatz in Vor-Ort-Testgeräten zur Detektion von Krankheitserregern.

Die automatisierte Bildauswertung, die auf Grundlage eines eigenen Scripts einen Kennwert für jedes Nanohole liefert, ermöglicht es, alle Nanoholes im Erfassungsbereich der Kamera parallel aufzuzeichnen, auszuwerten und zu klassifizieren. Mit dieser technologischen Basis können die Nanopartikel als Marker im Nanohole nachgewiesen werden. Das macht das Potential dieser Hybridnanostruktur als Biochip deutlich. Durch die geringe Größe der Nanoholes kann eine hohe Informationsdichte erzielt werden. Mittels paralleler Datenauswertung können dann alle Nanoholes zeiteffizient ausgelesen und weiterverarbeitet werden.

Um die Möglichkeiten einer schnellen Bild- und Signalverarbeitung auf die mikrospektroskopischen Messungen, bei denen jedes Nanohole einzeln gemessen wird, erweitern zu können und die Anzahl der gleichzeitig spektral gemessenen Nanoholes zu erhöhen, wurden die Vorzüge einer hyperspektralen Bildgebung untersucht. Die Verarbeitung von Kameradaten gepaart mit der hohen spektralen Auflösung eines Spektrometers führt zu einer hohen Effizienz und einer großen Anzahl parallel gemessener Daten. Um diese Möglichkeit zu realisieren, wurde ein bildgebendes Spektrometer entwickelt und aufgebaut. Mit diesem Spektrometer ist es zum einen möglich, von jedem Pixel in einem Bild ein Spektrum mit einer Auflösung bis nahezu 0,17 nm zu erhalten. Zum anderen vereint dieses Spektrometer den Wunsch nach einer hohen spektralen Auflösung mit den Forderungen nach einer effizienten und parallelen Datengewinnung und -verarbeitung für einzelne Nanoholes. Dazu wurde eine Software zur Ansteuerung des Spektrometers und zur Datenauswertung entwickelt. Das Spektrometer wurde erfolgreich in Betrieb genommen, wobei zahlreiche Testmessungen sowohl in Auf- als auch in Durchlicht durchgeführt wurden. Durch zusätzlich gemessene Laserlinien wurde die Wellenlängenskala bestimmt. Die Ergebnisse der Testmessungen zeigen, dass einzelne Nanoobjekte spektral aufgenommen und ausgewertet werden können. Dabei konnte durch Fluoreszenzmessungen gezeigt werden, dass sowohl eine Immobilisierung von Fängermolekülen im Nanohole möglich ist, als auch die Hybridisierung von mit Nanopartikeln markierter DNA. Ein Einsatz der Nanostruktur als Biochip ist daher denkbar. Der Vorteil besteht vor allem in der schnellen und effizienten Bildverarbeitung, da nur das Vorhandensein des Partikels im Loch nachgewiesen werden muss und keine weiteren spektralen Informationen nötig sind.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu der neuentwickelten Hybridnanostruktur zum einen ein großes Potential für die Biosensorik, aber auch das Potential eines miniaturisierten Biochips. Im Zusammenspiel mit dem entwickelten bildgebenden Spektrometer ist die vorgestellte Hybridnanostruktur, bestehend aus Chromnanoholes und Edelmetallnanopartikeln, eine hervorragende Plattform für die Bioanalytik, zum Beispiel zur Erkennung von Krankheitserregern.

Die hier durchgeführte Charakterisierung der Nanostruktur ist erst die Grundlage auf dem Weg zu einem voll etablierten Messsystem auf Basis dieser Struktur. Weitere Arbeiten könnten sich daher unter anderem auf die Optimierung der Protokolle zur Immobilisierung und Hybridisierung der Biomoleküle erstrecken. Die Verbesserung der statistischen Verteilung der Messwerte durch die Einbeziehung anderer Partikelsorten ist ein weiterer Schritt, um das Potential dieser Plattform auszuschöpfen. Aber auch die Entwicklung und Verbesserung des bildgebenden Spektrometers sollte weiter vorangetrieben werden. Insbesondere der mechanische Aufbau und die Probenhandhabung müssen vom Laboraufbau zu einem Messsystem weiterentwickelt werden. Weiterhin sollte ein Längenmesssystem in das Messsystem integriert werden, um die spektrale Auswertung zu verbessern. Die weiteren Entwicklungen sollten so vorangetrieben werden, dass auf dem Fundament dieser Arbeit ein komplettes Analysegerät für die Vor-Ort-Diagnostik entsteht, das zum einen die neue

Hybridnanostruktur als Sensorplattform nutzt und zum anderen das entwickelte bildgebende Spektrometer zur Messwertgewinnung einsetzt.



# Literaturverzeichnis

- [1] M. Faraday, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1857**, 147, 145–181
- [2] H. Siedentopf, R. Zsigmondy, *Annalen der Physik* **1902**, 315, 1, 1–39, doi:10.1002/andp.19023150102
- [3] T. Mappes, N. Jahr, A. Csaki, N. Vogler, J. Popp, W. Fritzsche, *Angewandte Chemie* **2012**, 124, 45, 11370–11375, doi:10.1002/ange.201204688
- [4] A. Agrawal, C. Zhang, T. Byassee, R. A. Tripp, S. Nie, *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 4, 1061–1070
- [5] J. N. Anker, J. N. Anker, O. Lyandres, O. Lyandres, J. Zhao, R. P. Van Duyne, *Nature Materials* **2008**, 7, 6, 442–453, doi:10.1038/nmat2162
- [6] G. Mie, *Annalen der Physik* **1908**, 3
- [7] P. Drude, *Annalen der Physik* **1900**, 3, 306, 566–613
- [8] A. Sommerfeld, H. Bethe, *Elektronentheorie der Metalle*, chapter Vol. 24-2, Springer Verlag **1933**, 333–622
- [9] M. Born, E. Wolf, *Principles of optics*, Cambridge University Press, 7th expanded Auflage **2002**
- [10] U. Kreibig, M. Vollmer, *Optical Properties of Metal Clusters*, Springer Series in Material Science 25 **1995**
- [11] A. Otto, *Zeitschrift für Physik D* **1968**, 216, 398–410
- [12] E. Kretschmann, *Zeitschrift für Physik D* **1971**, 241, 313–324
- [13] W. J. Padilla, D. N. Basov, D. R. Smith, *Materials Today* **2006**, 9, 7-8, 28–35
- [14] D. Smith, J. Pendry, *Science* **2004**, 305, August, 788–792
- [15] H. A. Bethe, *Physical Review* **1944**, 66, 7-8, 163–182
- [16] T. W. Ebbesen, H. J. Lezec, H. F. Ghaemi, T. Thio, P. A. Wolff, *Nature* **1998**, 391, 6668, 667–669
- [17] J. Parsons, E. Hendry, C. P. Burrows, B. Auguié, J. R. Sambles, W. L. Barnes, *Physical Review B* **2009**, 1–4
- [18] W. A. Murray, S. Astilean, W. L. Barnes, *Physical Review B* **2004**, 69, 16, 1–7, doi:10.1103/PhysRevB.69.165407
- [19] T. Rindzevicius, Y. Alaverdyan, M. Kall, W. A. Murray, W. L. Barnes, *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 32, 11806–11810
- [20] K. G. Lee, Q.-h. Park, *Physical Review Letters* **2005**, 95, 10, 1–4, doi:10.1103/PhysRevLett.95.103902
- [21] H. Lezec, T. Thio, *Optics express* **2004**, 12, 16, 3629–3651
- [22] M. W. Docter, P. M. Van den Berg, P. F. Alkemade, V. G. Kutchoukov, O. M. Piciu, A. Bossche, I. T. Young, Y. Garini, *Journal of Nanophotonics* **2007**, 1, 1, 011665, doi:10.1117/1.2794786
- [23] T. Thio, H. F. Ghaemi, H. J. Lezec, P. A. Wolff, T. W. Ebbesen, *October* **1999**, 16, 10, 1743–1748
- [24] E. Popov, N. Bonod, P. Chaumet, *Applied Optics* **2005**, 44, 12, 2332–2337, doi:0003-6935/05/122332-06
- [25] A. Degiron, T. Ebbesen, *Optics express* **2004**, 12, 3694–3700
- [26] Y. Xie, A. R. Zakharian, J. V. Moloney, M. Mansuripur, *Optics Express* **2006**, 14, 14, 6400–6413
- [27] S. H. Chang, S. Gray, G. Schatz, *Optics Express* **2005**, 13, 3150–3165
- [28] M. Reismann, C. Dahmen, G. V. Plessen, *Appl. Phys.B* **2006**, 84, 229–232, doi:10.1007/s00340-006-2325-8

- [29] M. Treacy, *Physical Review B* **2002**, 66, 19, 1–11, doi:10.1103/PhysRevB.66.195105
- [30] J. M. Brok, H. P. Urbach, *Optics Express* **2006**, 14, 7, 2845–2848
- [31] Q. Cao, P. Lalanne, *Physical Review Letters* **2002**, 88, 5, 3–6, doi:10.1103/PhysRevLett.88.057403
- [32] J. H. Wu, *Optics letters* **2011**, 36, 17, 3440–2
- [33] R. Müller, C. Ropers, C. Lienau, *Optics Express* **2004**, 12, 21
- [34] F. J. Valdivia-Valero, M. Nieto-Vesperinas, *Optics express* **2011**, 19, 12, 11545–57
- [35] A. G. Brolo, E. Arctander, R. Gordon, B. Leathem, K. L. Kavanagh, P. O. Box, *Nano Letters* **2004**, 4, 10, 2015–2018
- [36] M. Nic, J. Jirat, B. Kosata, A. Jenkins, *Compendium of Chemical Terminology (the "Gold Book")*, IUPAC **1997**
- [37] C. Y. Chen, I. Karube, *Current opinion in biotechnology* **1992**, 3, 1, 31–9
- [38] L. C. Clark, C. Lyons, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1962**, 102, 1, 29–45, doi:10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x
- [39] L. Carrascosa, M. Moreno, M. Álvarez, L. Lechuga, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2006**, 25, 3, 196–206, doi:10.1016/j.trac.2005.09.006
- [40] O. Saiapina, V. Pyeshkova, O. Soldatkin, V. Melnik, B. A. Kurc, A. Walcarius, S. Dzyadevych, N. Jaffrezic-Renault, *Materials Science and Engineering: C* **2011**, 31, 7, 1490 – 1497, doi:10.1016/j.msec.2011.06.003
- [41] C. Okafor, D. Grooms, E. Alocilja, S. Bolin, *Sensors* **2008**, 8, 9, 6015–6025, doi:10.3390/s8096015
- [42] C. Leiterer, S. Berg, N. Jahr, G. Brönstrup, S. Christiansen, A. Csaki, W. Fritzsche, in *Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Conference Series*, volume 8068 of *Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Conference Series* **2011**, doi:10.1117/12.886576
- [43] S. Lorkowski, G. Lorkowski, P. Cullen, *Biochemische Methoden* **2000**, 34, 6, 356–372
- [44] L. H. Augenlicht, D. Kobrin, *Cancer research* **1982**, 1088–1093
- [45] U. Maskos, E. M. Southern, *Nucleic Acids Research* **1992**, 20, 7, 1679–1684, doi:10.1093/nar/20.7.1679
- [46] J. Meinkoth, G. Wahl, *Analytical Biochemistry* **1984**, 138, 2, 267 – 284, doi:10.1016/0003-2697(84)90808-X
- [47] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, *Science (New York, N.Y.)* **1995**, 270, 5235, 467–70
- [48] R. Möller, A. Csaki, J. Köhler, W. Fritzsche, *Langmuir* **2001**, 17, 5426–5430
- [49] M. Urban, R. Moller, W. Fritzsche, *Review of Scientific Instruments* **2003**, 74, 2, 1077–1081
- [50] J. Homola, S. S. Yee, G. Gauglitz, U. Tu, *Sensors and Actuators B: Chemical* **1999**, 54, 1-2, 3–15, doi:10.1016/S0925-4005(98)00321-9
- [51] B. O. Liedberg, C. Nylander, I. Lundstrom, *Sensors and Actuators* **1983**, 4, 299–304
- [52] C. Nylander, B. Liedberg, T. Lind, *Sensors and Actuators* **1982**, 3, 79–88, doi:10.1016/0250-6874(82)80008-5
- [53] J. Wenger, P. F. Lenne, E. Popov, H. Rigneault, J. Dintinger, T. Ebbesen, J. Wegner, P. F. Lenne, E. Popov, H. Rigneault, J. Dintinger, T. Ebbesen, *Optics express* **2005**, 13, 18, 7035–7044
- [54] A. De Leebeeck, L. K. S. Kumar, V. de Lange, D. Sinton, R. Gordon, A. G. Brolo, A. {De Leebeeck}, L. K. S. Kumar, V. de Lange, D. Sinton, R. Gordon, A. G. Brolo, A. De Leebeeck, L. K. S. Kumar, V. de Lange, D. Sinton, R. Gordon, A. G. Brolo, *Analytical chemistry* **2007**, 79, 11, 4094–4100, doi:10.1021/ac070001a
- [55] A. Lesuffleur, H. Im, N. C. Lindquist, K. S. Lim, S. H. Oh, *Optics Express* **2004**, 16, 1, 219–224



- [56] J. Wegner, H. Rigneault, J. Dintinger, D. Marguet, P.-F. Lenne, *Journal of Biological Physics* **2006**, 32, 18–21, doi:10.1007/s10867-006-2909-x
- [57] H. Im, J. N. Sutherland, J. a. Maynard, S.-H. Oh, *Analytical chemistry* **2012**, 84, 4, 1941–7, doi:10.1021/ac300070t
- [58] S. Tokonami, Y. Yamamoto, H. Shiigi, T. Nagaoka, *Analytica Chimica Acta* **2012**, 716, 0, 76 – 91, doi:10.1016/j.aca.2011.12.025
- [59] N. J. Halas, S. Lal, W.-S. Chang, S. Link, P. Nordlander, *Chemical reviews* **2011**, 111, 6, 3913–61, doi:10.1021/cr200061k
- [60] A. Steinbrück, A. Csaki, K. Ritter, M. Leich, J. M. Köhler, W. Fritzsche, *Journal of Biophotonics* **2008**, 1, 2, 104–113, doi:10.1002/jbio.200810003
- [61] J. Melngailis, *Research Section B: Beam Interactions with Materials* **1993**, 81, 1271–1280
- [62] S. Reyntjens, *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2001**, 11, 287–300
- [63] S.-M. Yang, S. G. Jang, D.-G. Choi, S. Kim, H. K. Yu, *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2006**, 2, 4, 458–75, doi:10.1002/sml.200500390
- [64] M. a. Wood, *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* **2007**, 4, 12, 1–17, doi:10.1098/rsif.2006.0149
- [65] J. C. Hulteen, *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces and Films* **1995**, 13, 3, 1553, doi:10.1116/1.579726
- [66] T. R. Jensen, M. D. Malinsky, C. L. Haynes, R. P. Van Duyne, *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, 104, 45, 10549–10556, doi:10.1021/jp002435e
- [67] J. Prikulis, P. Hanarp, L. Olofsson, D. Sutherland, M. Käll, *Nano Letters* **2004**, 4, 6, 1003–1007
- [68] P. Hanarp, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2003**, 214, 1-3, 23–36, doi:10.1016/S0927-7757(02)00367-9
- [69] Y. B. Zheng, S. J. Wang, *Journal of applied physics* **2006**, 99, 1–4, doi:10.1063/1.2169867
- [70] Q. Yan, F. Liu, L. Wang, J. Y. Lee, X. S. Zhao, *Journal of material chemistry* **2006**, 16, 22, 2132–2134, doi:10.1039/b604463h
- [71] T. Rindzevicius, Y. Alaverdyan, B. Sepulveda, T. Pakizeh, M. Käll, R. Hillenbrand, J. Aizpurua, F. J. García de Abajo, *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 3, 1207–1212
- [72] S. Lee, K. Bantz, N. Lindquist, S. Oh, C. Haynes, *Langmuir* **2009**, 268, 12, 13685–13693, doi:10.1021/la9020614
- [73] P. A. Kralchevsky, K. Nagayama, *Advances in colloid and interface science* **2000**, 85, 145–192
- [74] N. Denkov, O. Velev, P. Kralchevski, I. Ivanov, *Langmuir* **1992**, 8, 3183–3190
- [75] P. a. Kralchevsky, K. Nagayama, *Langmuir* **1994**, 10, 1, 23–36, doi:10.1021/la00013a004
- [76] O. D. Velev, K. Furusawa, K. Nagayama, *Langmuir* **1996**, 12, 10, 2374–2384, doi:10.1021/la9506786
- [77] A. S. Dimitrov, K. Nagayama, *Langmuir* **1996**, 12, 5, 1303–1311, doi:10.1021/la9502251
- [78] L. Isa, K. Kumar, M. Müller, J. Grolig, M. Textor, E. Reimhult, *ACS nano* **2010**, 4, 10, 5665–70, doi:10.1021/nn101260f
- [79] M. L. Juan, R. Gordon, Y. Pang, F. Eftekhari, R. Quidant, *Nature Physics* **2009**, 5, 12, 915–919, doi:10.1038/nphys1422
- [80] D. Xia, S. R. J. Brueck, *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures* **2004**, 22, 6, 3415, doi:10.1116/1.1821582
- [81] Y. Xia, G. m. Whitesides, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **1998**, 37, 550–575
- [82] D. K. Schwartz, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2001**, 52, 107–137

- [83] K. a. Peterlinz, R. Georgiadis, *Langmuir* **1996**, 12, 20, 4731–4740, doi:10.1021/la9508452
- [84] V. Chechik, R. M. Crooks, C. J. M. Stirling, *Advanced Materials* **2000**, 12, 16, 1161–1171, doi:10.1002/1521-4095(200008)12:16<1161::AID-ADMA1161>3.0.CO;2-C
- [85] G. Mani, D. M. Johnson, D. Marton, V. L. Dougherty, M. D. Feldman, D. Patel, A. A. Ayon, C. M. Agrawal, *Langmuir* **2008**, 24, 13, 6774–6784
- [86] A. Chandekar, S. K. Sengupta, J. E. Whitten, *Applied Surface Science* **2010**, 256, 2742–2749, doi:10.1016/j.apsusc.2009.11.020
- [87] E. Balaour, J. M. Macak, L. Taveira, P. Schmuki, *Scanning* **2005**, 7, July, 1066–1070, doi:10.1016/j.elecom.2005.07.014
- [88] J. M. Ferreira, S. Marcinko, R. Sheardy, A. Y. Fadeev, *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, 286, 258–262, doi:10.1016/j.jcis.2004.11.008
- [89] R. Helmy, A. Y. Fadeev, *Chart* **2002**, 3, 18, 8924–8928
- [90] R. Hofer, M. Textor, N. D. Spencer, C. Zu, *Langmuir* **2001**, 17, 4014–4020
- [91] S. Marcinko, A. Y. Fadeev, *Langmuir* **2004**, 20, 2270–2273
- [92] S. Tosatti, R. Michel, M. Textor, N. D. Spencer, *Significance* **2002**, 3858, 7, 3537–3548
- [93] Y. Cui, M. T. Björk, J. A. Liddle, C. Sönnichsen, B. Boussert, a. P. Alivisatos, *Nano Letters* **2004**, 4, 6, 1093–1098, doi:10.1021/nl049488i
- [94] S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Högberg, F. Graf, W. M. Shih, *Nature* **2009**, 459, 7245, 414–8, doi:10.1038/nature08016
- [95] J. C. Garno, Y. Yang, N. a. Amro, S. Cruchon-Dupeyrat, S. Chen, G.-Y. Liu, *Nano Letters* **2003**, 3, 3, 389–395, doi:10.1021/nl025934v
- [96] L. V. Govor, G. Reiter, J. Parisi, G. H. Bauer, *Physical Review E* **2004**, 69, 061609, 1–8, doi:10.1103/PhysRevE.69.061609
- [97] T. Kraus, L. Malaquin, H. Schmid, W. Riess, N. D. Spencer, H. Wolf, *Nature Nanotechnology* **2007**, 2, 570–576, doi:10.1038/nnano.2007.262
- [98] L. Malaquin, T. Kraus, H. Schmid, E. Delamarche, H. Wolf, *Langmuir* **2007**, 23, 11513–11521
- [99] U. Srinivasan, D. Liepmann, R. T. Howe, *Design* **2001**, 10, 1, 17–24
- [100] J. Chen, W.-s. Liao, X. Chen, T. Yang, S. E. Wark, D. H. Son, J. D. Batteas, P. S. Cremer, *ACS nano* **2009**, 3, 1, 173–180
- [101] J. Becker, O. Schubert, C. Sönnichsen, *Nano letters* **2007**, 7, 6, 1664–9, doi:10.1021/nl070627g
- [102] J. Boleininger, A. Kurz, V. Reuss, C. Sönnichsen, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2006**, 8, 33, 3824, doi:10.1039/b604666e
- [103] R. Heintzmann, K. Lidke, T. Jovin, *Optics express* **2004**, 12, 5, 753–63
- [104] R. D. Alcock, J. M. Coupland, *Measurement Science and Technology* **2006**, 17, 11, 2861–2868, doi:10.1088/0957-0233/17/11/001
- [105] L.-J. Chen, T.-F. Kao, J.-Y. Lu, C.-K. Sun, *Optics express* **2006**, 14, 9, 3840–6
- [106] M. Pisani, M. Zucco, *Optics express* **2009**, 17, 10, 8319–31
- [107] V. Jovanov, E. Bunte, H. Stiebig, D. Knipp, *Optics letters* **2011**, 36, 2, 274–6
- [108] D. Aherne, D. M. Ledwith, M. Gara, J. M. Kelly, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, 18, 2005–2016, doi:10.1002/adfm.200800233
- [109] C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, S. Gao, L. Chi, S. Peschel, U. Simon, *Colloid & Polymer Science* **2001**, 279, 1, 68–72, doi:10.1007/s003960000429

- [110] R. Möller, A. Csaki, J. M. Kohler, W. Fritzsche, *Nucleic Acids Res* **2000**, 28, 20, E91
- [111] J. B. Lamture, K. L. Beattie, B. E. Burke, M. D. Eggers, D. J. Ehrlich, R. Fowler, M. a. Hollis, B. B. Kosicki, R. K. Reich, S. R. Smith, *Nucleic acids research* **1994**, 22, 11, 2121–5
- [112] T. Schöler, R. Kretschmer, S. Jessing, M. Urban, W. Fritzsche, R. Möller, J. Popp, *Biosensors & bioelectronics* **2009**, 25, 1, 15–21, doi:10.1016/j.bios.2009.05.040
- [113] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, 382, 6592, 607–609, doi:10.1038/382607a0
- [114] Veeco, Training handbook for AFM **2003**
- [115] A. Köhler, *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik* **1893**, 10, 4, 28
- [116] R. McGill, J. W. Turkey, W. A. Larsen, *The American Statistician* **1978**, 32, 1, 12–16
- [117] C. Hafner, *Post-modern Electromagnetics Using intellignet Maxwell Solvers*, John Wiley & Sons **1999**
- [118] C. Hafner, *Physica Status Solidi B-Basic Solid State Physics* **2007**, 244, 10, 3435–3447, doi:10.1002/pssb.200743165
- [119] A. Steinbrück, O. Stranik, A. Csaki, W. Fritzsche, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2011**, 401, 4, 1241–9, doi:10.1007/s00216-011-5177-y
- [120] R. V. Craster, O. K. Matar, K. Sefiane, *Interface* **2009**, 25, 6, 3601–3609
- [121] W. Barnes, *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics* **2009**, 11, 114002, doi:10.1088/1464-4258/11/11/114002
- [122] C. Sönnichsen, S. Geier, N. E. Hecker, G. von Plessen, J. Feldmann, H. Ditlbacher, B. Lamprecht, J. R. Krenn, F. R. Aussenegg, V. Z.-H. Chan, J. P. Spatz, M. Möller, *Applied Physics Letters* **2000**, 77, 19, 2949, doi:10.1063/1.1323553
- [123] G. Festag, A. Steinbrück, A. Csáki, R. Möller, W. Fritzsche, *Nanotechnology* **2007**, 18, 1, 015502, doi:10.1088/0957-4484/18/1/015502
- [124] R. Verdoold, R. Gill, F. Ungureanu, R. Molenaar, R. P. H. Kooyman, *Biosensors & bioelectronics* **2011**, 27, 1, 77–81, doi:10.1016/j.bios.2011.06.019
- [125] F. Ungureanu, D. Wasserberg, N. Yang, R. Verdoold, R. P. Kooyman, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2010**, 150, 2, 529–536, doi:10.1016/j.snb.2010.08.044
- [126] M. Anwar, *Hybrid plasmonic nanostructures - Nanoholes characterization of nanoholes combined with gold nanoparticles*, Master's thesis, Universität Jena **2012**
- [127] T.-Y. Tseng, P.-J. Lai, K.-B. Sung, *Optics express* **2011**, 19, 2, 1291–300



# A

## A.1 Materialien

Nr.	Chemikalie	Reinheit, Konzentration	Hersteller
1	Ethanol	reinst, 96%	Roth
2	Ethanol	absolut reinst für Molekularbiologie	Roth
3	Aceton	zur Analyse	Merck
4	Ammoniak	25% zur Analyse	Sigma
5	6-Mercapto-1-hexanol	reinst. > 97%	Sigma
6	Kaliumchlorid	zur Synthese, reinst	Roth
7	Kaliumdihydrogenphosphat	MicroSelect, für Molekularbiologie	Fluka
8	Methanol	zur Analyse	Roth
9	Natriumchlorid	für Molekularbiologie	Merck
11	Rotisol	Ethanol wasserfrei 94%, Aceton 5%, Methylethyketon 1% (v/v))	Roth
12	Salzsäure	37% zur Analyse	Merck
13	Wasserstoffperoxid	30% zur Analyse	Merck
14	Toluol	getrocknet zur Analyse	Merck
15	tri-Natriumcitrat-Dihydrat	für Molekularbiologie, > 99,5%	Merck
16	tri-Natrium-Dodecahydrat	zur Analyse	Merk
17	di-Natriumhydrogenphosphat	wasserfrei, zur Analyse	Merck
18	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan	purissimum, >99,9%	Sigma
19	Tween-20	zur Analyse	Fluka
20	Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	96%	Merck
21	Natriumborhydrid	97% Granulat	Roth
22	Mercaptoundecansäure	5 mM in Ethanol	Sigma
23	Silbernitrat	reinst	Merck
24	Poly(Natrium 4-Styrol-Sulfonat), PSS	1e6 M <sub>w</sub>	Sigma
25	Triton X-100	für Molekularbiologie	Fluka
26	Ethanolamin	zur Analyse	Merck
27	Ascorbinsäure	≥ 99, % p.a.	Roth
28	Polydimethylsiloxan (PDMS)	reinst	Dow Corning
29	Lachssperma	zur Analyse	/
30	Isopropanol	zur Synthese	Merck

31	Kaliumphosphat Pufferlösung	zur Analyse	
32	1-Dodeceylphosphonsäure	95%	Alfa Asar
33	(3-Glycidoxypentyl) trimethoxysilan	98%	ABCR
34	20x SSC Pufferlösung (pH 7,0)	ready-to-use, dampf-sterilisiert	Roth
35	Polyvinyl pyrrolidone	zur Analyse	Sigma
36	D- Glucose	wasserfrei	Merck
37	Albumine bovine serum (BSA)	zur Analyse	Roth
38	Silver enhancement kit SEKL-15	/	BBi
39	Denhardstreagenz	reinst	/
40	Remover -> 1-Aminopropan-2-ol, Dipropylenglycolmonomethylether	reinst	Clariant

## A.2 Geräte

Nr.	Gerät	Hersteller
1	Axiomager Z1.m mit Mrc5 Kamera und Spektrometerauskopplung	Carl Zeiss GmbH Jena
2	Axiomager A1.m mit Mrc5 Kamera und SensiCam (Floureszenzkamera)	Carl Zeiss Jena, PCO AG, Keilheim
3	Spektrometer SP2300i mit Pixis250 Kamera	Princeton Instruments
4	Spektrophotometer Jasco V-670	Jasco, JPN
5	Rasterkraftmikroskop Dimension 3100 mit Nanoscope III Controller	Digital Instruments, Santa Barbara (CA, USA)
6	Rasterelektronenmikroskop Jeol JSM 6700F	Jeol Europe B.V., Zaventem (BEL)
7	Transmissions-elektronenmikroskop CEM 902A	Carl Zeiss GmbH Jena
8	Kontaktwinkelmessplatz mit Microdrop MD-E-201 und VC 2810 Kamera	microdrop Gesellschaft für Mikrodosiersysteme mbH, VICON Industries Inc.
9	Konstantklimaschrank Binder KBF 115	Binder GmbH, Tuttlingen
10	Plasmaätzer Tepla	Tepla, München
11	Kamera Stingray F145B	Allied Vision Technologies GmbH, Stadtroda
12	Laser angeregte Lichtquelle EQ-99	Energetiq Technology Inc., (MA,USA)
13	Focused Ion Beam Lyra FIB-FESEM	TESCAN, Brno (CZ)

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg, der zur Entstehung dieser Dissertation geführt hat, begleitet haben.

Herrn Prof. Eberhard Manske danke ich für die Betreuung seitens der TU Ilmenau, und für die Zeit, mir mit Rat und Tat bei Seite zu stehen, um mir alle Fragen rund um die Dissertation zu beantworten.

Bei meinem Chef und Betreuer am IPHT PD Dr. Wolfgang Fritzsche möchte ich mich herzlich für die Möglichkeit bedanken, in der Gruppe Nanobiophotonik an sehr unterschiedlichen und interessanten Aufgaben zu arbeiten und auch für die Hilfe und Unterstützung, die er mir während meiner ganzen Zeit gewährt hat.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich Frau Dr. Andrea Csàki aussprechen, die jederzeit mit Tipps und Hilfe zur Stelle war und stets den ganzen Laden zusammengehalten hat. Auch wenn wir uns nicht über die Feinheiten der deutschen Sprache einigen konnten, so hatten wir stets viel Spaß bei der Arbeit.

Franka Jahn möchte für das immer zuverlässige Erstellen von Aufnahmen mit den Elektronenmikroskopen danken und dass dies auch immer kurzfristig möglich war. Außerdem danke ich ihr für die viele Arbeit, die sie immer in die Organisation der Seminarfahrten steckte, damit wir eine entspannte und bestens organisierte Seminarfahrt haben konnten.

Auch möchte ich mich bei allen Leuten aus dem Reinraum bedanken, die für mich die Nanostrukturen herstellten und auch bei vielen anderen kleineren Problemen helfen konnten. Besonders danke ich dabei Dr. Uwe Hübner, Rüdiger Pöhlmann, Dr. Siegmund Schröter, Katrin Kandra und Elmar Voigt.

Meinen Bürokollegen Dr. Robert Müller, Dr. Ondra Stranik und Christian Leiterer danke ich für die vielen Tipps und hilfreichen Diskussionen, die wir innerhalb und außerhalb unseres Büros geführt haben und die mich immer ein Stück in meiner Arbeit voran gebracht haben.

Mamuna Anwar danke ich für den Fleiß und die Ausdauer, die sie in die Messung der vielen Nanoholes gesteckt hat, während sie an ihrer Masterarbeit arbeitete.

Bei allen Mitstreitern aus dem IPHT und besonders bei allen Kollegen der Nanobiophotonik möchte ich mich für die einzigartige Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung bedanken, die ich erhalten habe. Besonders danken möchte ich dabei Janina Wirth, die immer gern einfach so geholfen hat, bei Nicole Franke für ihre Unterstützung bei der Arbeit, bei Frau Göbel von der Bibliothek für all die Literatur, die sie besorgt hat, bei Julia Meyer-Ilse für die vergnüglichen Kaffeepausen und die Hilfe bei der Korrektur meiner englischen und deutschen Text, und natürlich bei allen anderen, die mir auf die eine oder andere Art geholfen haben.

An dieser Stelle sei auch allen Mitarbeitern aus der Werkstatt gedankt, die immer mit viel Hingabe die Bauteile gefertigt haben, die ich benötigte und mir dabei immer mit Rat und vielen Tipps zur Seite standen.

Besonders danke ich auch Dr. Nadine Vogler, die mir nicht nur bei programmiertechnischen Problemen half, sondern auch beim Korrekturlesen meiner Texte. Sie ist neben einer hilfsbereiten Kollegin auch eine tolle Arnisadora und teure Freundin geworden, bei der ich mich ganz herzlich bedanken möchte.

Einen tiefen persönlichen Dank schulde ich meiner Freundin Sabrina, die mich in allem unterstützt, angetrieben und sich stets darum gekümmert hat, dass ich bei guter Laune blieb und nicht verzweifelt ist, wenn meine Texte mal keinen Sinn ergaben. Ich möchte ihr für ihre Zielstrebigkeit und Tatkraft herzlichst danken, mit der sie mich immer unterstützt und angesteckt hat.

Auch Inge Schlegel sei an dieser Stelle gedankt, dass sie sich die Zeit genommen hat, diese Arbeit zu lesen und ihr sprachlich den letzten Schliff zu verpassen.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken, die mich immer unterstützt hat und mir geholfen hat, meinen Weg zu finden.